

Veruska Cavalcanti Barros



**O papel de inibidores salivares e intestinais
do complemento humano na proteção do
intestino médio de triatomíneos**

**Belo Horizonte
Minas Gerais - Brasil
2009**



Veruska Cavalcanti Barros

O papel de inibidores salivares e intestinais do complemento humano na proteção do intestino médio de triatomíneos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Entomologia

Orientador: Prof. NELDER DE FIGUEIREDO GONTIJO

Co-orientador: Prof. MARCOS HORÁCIO PEREIRA

Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos

Departamento de Parasitologia - ICB/UFMG

Belo Horizonte, agosto de 2009

043

Barros, Veruska Cavalcanti.

O papel de inibidores salivares e intestinais do complemento humano na proteção do intestino médio de triatomíneos.

[manuscrito] / Veruska Cavalcanti Barros. – 2009.

76 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Nelder de Figueiredo Gontijo. Co-orientador: Marcos Horácio Pereira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Departamento de Parasitologia.

1. Inseto - Intestino médio - Teses. 2. Triatoma - Teses. 3. Inseto hematófago - Teses. 4. Saliva - Exame - Teses. I. Gontijo, Nelder de Figueiredo. II. Pereira, Marcos Horácio. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Parasitologia. IV. Título.

CDU:595.7

Trabalho realizado no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH) do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte MG, com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

**Às pessoas fundamentais da minha vida,
a minha família: Mamãe, Papai, Lou, Sá e Nan,
pelo apoio, compreensão e amor!!!**

Agradecimentos

Este trabalho não poderia ser concluído sem o apoio de muitas pessoas importantes que participaram direta ou indiretamente deste processo. Desta forma, eu não poderia deixar de agradecer a vocês...

Primeiramente, agradeço a Deus, por todas as pedras e flores que encontrei em minha estrada e que foram fundamentais para que eu me tornasse essa pessoa que sou. E acima de tudo, pela demonstração de amor e proteção, que senti nos momentos mais difíceis.

À minha família, mamãe, papai, Lousanne e Aguiar, Sabrina e Hernani. A vocês, meus queridos, muitíssimo obrigada por todo o apoio! Tenho certeza de que nada faria sentido, se eu não tivesse a presença de vocês em minha vida!

Aos queridos orientadores e amigos, Nelder de Figueiredo Gontijo e Marcos Horácio Pereira. Seu “Neldi”, eu poderia listar todo o apoio que recebi, que inclui o intelectual, o científico, os conselhos pessoais, o apoio no concurso, até mesmo o apoio financeiro, e mesmo assim não conseguiria expor aqui, toda a minha gratidão. Nos momentos mais difíceis, você apareceu e me deu a oportunidade de continuar a minha caminhada. Gostaria de deixar registrado aqui o meu eterno agradecimento!!! Seu Marcos, embora de uma forma diferente, mas totalmente imprescindível, você foi fundamental em todas as etapas deste trabalho, contudo eu digo,

muito obrigada pelas inúmeras discussões sobre o trabalho, pelos “puxões de orelha” e pelos conselhos necessários nos momentos oportunos. Sei que antes de qualquer relação de trabalho, posso considerá-los meus grandes amigos!! Muito obrigada por tudo.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, aos nossos Coordenadores do curso, Professor Marcos Horácio Pereira e Pedro Marcos Linardi, pela dedicação e empenho, além do apoio especial e carinho! À secretária e amiga especial, Sumara, pelo apoio e pelo colo que recebi em muitos momentos difíceis. Muito obrigada!!!

Ao Departamento de Parasitologia, em nome de todos os professores e funcionários, pela infra-estrutura e pela qualidade de ensino, importantes na minha formação e na execução deste trabalho. Um agradecimento especial aos professores, Alan Lane de Melo, Ramiro Botelho e Walter dos Santos Lima, pelo carinho e amizade.

Às instituições de fomento, CAPES e CNPq, pela bolsa concedida.

À Universidade Federal do Piauí e ao Departamento de Parasitologia e Microbiologia, em nome do chefe do Departamento, prof. Reginaldo Roris Cavalcante pelo apoio dado durante o meu doutoramento.

Aos meus queridos estagiários: Jéssica Góes de Assumpção e André Cadete Miranda. Vocês sabem do importante papel que exerceram neste trabalho, e eu não poderia deixar de agradecer por toda a dedicação e apoio!!!

Ao Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos. MUITÍSSIMO abrigada ao César, pela participação efetiva na execução deste trabalho. Aos colegas Vânia, Vladimir, Fernanda, Rafaela, Iâncor e Bruno. Vocês fazem parte de uma família que ganhei em Belo Horizonte, obrigada pela convivência agradável e pelos momentos divertidos e a todos os outros que passaram, durante o meu período no “Lab”, muito obrigada.

Aos meus amigos especiais e inesquecíveis, Adriana Coelho Soares, Ricardo Nascimento Araújo, Thelma de Filippis, Luciana Pompermayer, Michelle Freitas e Antonio Ferreira Mendes Sousa, pelo apoio e amizade, pelos conselhos, pela alegria e pelos momentos de “happy hours” maravilhosos. Muito obrigada!!

À Simone Malta e família, em especial a minha “melhor amiga”, Maria Eduarda Malta Lessa. Obrigada pela amizade, pelo apoio em todos os momentos. Dudinha, obrigada por me presentear com sua alegria, o seu brilho e a sua inocência!

Obrigada a todos vocês!!!!

SUMÁRIO

	Página
Lista de ilustrações	xi
Lista de tabelas	xiii
Lista de abreviaturas e siglas	xiv
Resumo	xv
Abstract	xvi
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Importância dos triatomíneos	18
1.2 Importância farmacológica da saliva de artrópodes hematófagos	20
1.3 O sistema complemento humano	21
1.3.1 A via Clássica	21
1.3.2 A via da Lectina	22
1.3.3 A via Alternativa	24
1.3.4 Complexo de ataque à membrana (MAC)	24
1.3.5 Anafilatoxinas	25
1.3.6 Proteínas reguladoras	25
1.4 O papel de inibidores do complemento presentes na saliva e no intestino de artrópodes hematófagos	27
2. OBJETIVOS	29

2.1	Objetivo Geral	29
2.2	Objetivos Específicos	29
3.0	METODOLOGIA	31
3.1	Origem e manutenção dos insetos	31
3.2	Obtenção de extrato de glândula salivar de triatomíneos	31
3.3	Obtenção do conteúdo intestinal dos insetos em estudo	34
3.4	Obtenção de soro humano	34
3.5	Obtenção do homogenato de membranas perimicrovilares e microvilosidades intestinais de triatomíneos	35
3.6	Obtenção de hemolinfa de triatomíneos	35
3.7	Estudo do papel fisiológico dos inibidores do complemento na proteção do trato digestivo	36
3.8	Avaliação da ingestão salivar durante o procedimento da alimentação forçada	37
3.9	Determinação do pH do intestino médio anterior de <i>T. brasiliensis</i>	40
3.10	Estudo da influência do pH no funcionamento do sistema complemento humano	41
3.11	Ensaio da atividade inibidora da via alternativa do sistema complemento humano	42
3.12	Ensaio da atividade inibidora da via clássica do sistema complemento humano	43
3.12.1	Purificação de IgG total humano	44

3.13	Determinação da presença de inibidores de baixo peso molecular no conteúdo intestinal de <i>T. infestans</i> e <i>T. brasiliensis</i>	46
4.	RESULTADOS	47
4.1	Estudo do papel fisiológico dos inibidores do complemento na proteção do trato digestivo	47
4.2	Determinação do pH do intestino médio anterior de <i>T. brasiliensis</i> e o estudo da influência do pH no funcionamento do sistema complemento humano	51
4.3	Atividade inibidora das vias alternativa e clássica do sistema complemento presente na saliva e no conteúdo intestinal dos triatomíneos	53
4.4	Atividade do sistema complemento humano na presença de homogenato de membranas perimicrovilares e microvilosidades intestinais de triatomíneos	56
4.5	Determinação da presença de inibidores de baixo peso molecular no conteúdo intestinal de <i>T. infestans</i> e <i>T. brasiliensis</i>	57
4.6	Atividade inibidora do complemento sobre a deposição de C3b presente na hemolinfa dos triatomíneos	57
4.7	Atividade inibidora das vias alternativa e clássica do sistema complemento presente no conteúdo intestinal de fêmeas de <i>A. aegypti</i>	60
5.0	DISCUSSÃO	61
6.0	CONCLUSÕES	68
7.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1:	Esquema da fase de ativação do sistema complemento	23
FIGURA 2:	Glândulas salivares de <i>Triatoma infestans</i> (A) e <i>Rhodnius prolixus</i> (B) (Baptist, 1941)	33
FIGURA 3:	Aparato usado para alimentação forçada em ninfas de 4º estágio de <i>T. brasiliensis</i>	39
FIGURA 4:	Atividade da apirase no conteúdo intestinal solúvel de ninfas de 4º estágio <i>Rhodnius prolixus</i> após alimentação em alimentador artificial e alimentação forçada	48
FIGURA 5:	Proteção do intestino médio anterior de <i>T. brasiliensis</i> contra o ataque do sistema complemento: observação da deposição do MAC na parede intestinal	49
FIGURA 6:	Proteção do intestino médio anterior de <i>T. brasiliensis</i> contra o ataque do sistema complemento: observação da morte celular após deposição do MAC	50
FIGURA 7:	Porcentagem de atividade do sistema complemento em diferentes pHs	52
FIGURA 8:	Porcentagem da atividade do sistema complemento humano medida através da deposição de C3b após o disparo da via clássica na presença do homogenato de membranas perimicrovilares e microvilosidades intestinais de triatomíneos	56

FIGURA 9:	Porcentagem da atividade do sistema complemento na presença do conteúdo intestinal (CI) de <i>T. brasiliensis</i> (Tb) e <i>T. infestans</i> (Ti) após ultrafiltração	58
FIGURA 10:	Porcentagem da atividade do sistema complemento na presença de hemolinfa dos triatomíneos	59
FIGURA 11:	Porcentagem de atividade do sistema complemento na presença de conteúdo intestinal de fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	60
FIGURA 12:	Esquema da fase de ativação do sistema complemento mostrando os pontos potencialmente alvos pelos inibidores salivares e intestinais dos triatomíneos	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1:	Porcentagem de inibição do sistema complemento pela saliva de <i>Triatoma brasiliensis</i> , <i>T. infestans</i> e <i>Rhodnius prolixus</i>	54
TABELA 2:	Porcentagem de inibição do sistema complemento pelo conteúdo intestinal de <i>Triatoma brasiliensis</i> , <i>T. infestans</i> e <i>Rhodnius prolixus</i>	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CR1: Receptor de C3b

C1inh: Inibidor de C1

C4bp: Proteína ligante ao C4b

DAF: Fator de Aceleração do Decaimento

HMEBN: 5mM HEPES/NaOH, 7mM MgCl₂, 10mM EGTA, 140mM NaCl e 5mg/mL BSA

HNB: 10mM HEPES/NaOH, 140mM NaCl e 1mg/mL BSA

HNCM: 4mM HEPES/NaOH, 145mM NaCl, 2mM CaCl₂ e 1mM MgCl₂

HRF: Fator de Restrição Homóloga

LTN: 0.1% de Leite em pó, 10mM TRIS-base/HCl e 140mM NaCl

LTNTC: 0.1% de Leite em pó, 10mM TRIS-base/HCl, 140mM NaCl, 5mM CaCl₂, e 0,05% Tween-20

MAC: Complexo de Ataque à Membrana

MBL: Lectina Ligante à Manose

MCP: Proteína Cofatora de Membrana

MET: 300mM Manitol, 5mM EGTA e 17mM TRIS-base/HCl

Min: Minuto

mM: Milimolar

NH¹: 10mM HEPES/NaOH, 140mM NaCl;

NH²: 10mM HEPES/NaOH, 860mM NaCl;

nm: Nanômetro

IP: Iodeto de Propídeo

kDa: QuiloDalton

RESUMO

A saliva de artrópodes hematófagos contém biomoléculas envolvidas diretamente ou indiretamente no processo de hematofagia, entre as quais estão moléculas inibidoras do sistema complemento. A função mais óbvia para estes inibidores seria a proteção do intestino médio contra danos causados pelo complemento. Para investigar esta hipótese, ninfas de *Triatoma brasiliensis* foram forçadas a ingerir soro humano em condições nas quais os inibidores salivares eram incapazes de proteger o intestino. Nestas condições, o epitélio do intestino médio anterior foi marcado e danificado pelo complemento, causando morte celular. Uma vez que a saliva de *Aedes aegypti* não contém inibidores do complemento, foi formulada a hipótese da possível existência destes inibidores no intestino médio. Assim, a atividade inibitória foi investigada no intestino de *A. aegypti*, na saliva e no intestino de três espécies de triatomíneos (*T. brasiliensis*, *T. infestans* e *Rhodnius prolixus*) por meio de um método imunológico capaz de determinar o nível de deposição de alguns fatores do complemento (C1q, C3b, ou C4b) na superfície de moléculas ativadoras em microplacas. Esta metodologia permitiu identificar em quais pontos da cascata do complemento as moléculas presentes na saliva ou no conteúdo intestinal de triatomíneos podem inibir o complemento. Foi verificado que tanto a saliva quanto o conteúdo intestinal solúvel das espécies de triatomíneos estudadas não inibiram a deposição de C1q pela via clássica. O conteúdo intestinal solúvel das três espécies de triatomíneos foi capaz de inibir a deposição de C4b pela via clássica. Somente a saliva de *T. brasiliensis* foi capaz de inibir a deposição de C4b. Ambos, saliva e conteúdo intestinal das três espécies de triatomíneos puderam inibir a deposição de C3b nas vias clássica e alternativa. Nenhum dos materiais extraídos das membranas de células intestinais dos triatomíneos inibiu a deposição de C3b na via clássica. Como esperado, o conteúdo intestinal solúvel de *A. aegypti* foi capaz de inibir a deposição de C3b pelas vias clássica e alternativa. A existência de inibidores de complemento pode apresentar consequências biológicas importantes tanto para o sucesso na hematofagia dos insetos quanto para o seu papel na interação com seus parasitos.

ABSTRACT

Saliva of haematophagous arthropods contain biomolecules involved directly or indirectly with the haematophagy process, and among them are encountered some complement system inhibitors. The most obvious function for these inhibitors would be the protection of the midgut against injury by the complement. To investigate this hypothesis, *Triatoma brasiliensis* nymphs were forced to ingest human serum in conditions in which the protection of midgut by the inhibitors is bypassed. In these conditions, the anterior midgut epithelium was injured by the complement, causing cell death. Once some insects such as *Aedes aegypti* have no salivary inhibitors, we hypothesized the existence of intestinal inhibitors. The inhibitory activity was investigated in the intestine of *A. aegypti* as well as in the saliva and intestine of three triatomines species (*T. brasiliensis*, *T. infestans* and *Rhodnius prolixus*) by using an immunological method able to determine the level of deposition of some complement factors (C1q, C3b, or C4b) on the surface of complement activator molecules linked to microplates. This methodology allowed identification of points along the activation phase of the complement cascade were inhibited. As expected, the soluble content of *A. aegypti*'s intestine was capable of inhibiting C3b deposition by the classical and alternative pathways. Saliva or soluble intestinal contents, obtained from triatomines were unable to inhibit C1q deposition by the classical pathway. C4b deposition by the classical pathway was inhibited by the intestinal contents from the three triatomines species. On the other hand, only *T. brasiliensis* saliva inhibited C4b deposition. Both, saliva and intestinal contents from all triatomines were able to inhibit C3b deposition in the classical and alternative pathways. None of the material extracted from the intestinal cell membranes from the triatomines inhibited C3b deposition in the classical pathway. The existence of complement inhibitors might lead to important biological consequences for the success in the haematophagy of the insects as for their role in the interaction with their parasites.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Importância dos triatomíneos

Os triatomíneos são insetos pertencentes à ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae, sendo reconhecidas 140 espécies agrupadas em 19 gêneros (Schofield e Galvão, 2009).

Estas espécies são paurometábolos, alimentando-se obrigatoriamente de sangue, durante toda a vida, desde os cinco estádios ninfais até a fase adulta. Além da espoliação sanguínea, os triatomíneos apresentam importância médica por serem os transmissores do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas nas Américas ou Tripanossomíase Americana (Chagas, 1909). Os triatomíneos também são responsáveis pela transmissão do protozoário *Trypanosoma rangeli*, considerado não-patogênico para diversos hospedeiros mamíferos, inclusive para os humanos (Coura et al., 1996; Guhl e Vallejo, 2003).

A tripanossomíase americana está distribuída do México ao norte da Argentina e ao sul do Chile, atingindo um total de 21 países americanos (OPAS, 2006). Estima-se que 8 a 11 milhões de pessoas encontram-se infectadas (<http://www.cdc.gov/chagas/epi.html>). Segundo a Organização Mundial da Saúde (2005), cerca de 28 milhões de pessoas moram em área de risco de contraírem a doença de Chagas no Brasil.

O principal mecanismo de transmissão da doença de Chagas ocorre através dos vetores triatomíneos. A transmissão vetorial ocorre quando triatomíneos infectados, ao picar em um hospedeiro vertebrado, defecam formas infectantes do parasito, nas proximidades do local da picada. Estas, ao entrar em contato com uma mucosa ou lesão na pele, podem infectar o hospedeiro (Dias, 1987; Massad, 2008).

Dentre as espécies de triatomíneos, o *Triatoma infestans* Neiva, 1911 (Triatominae, Triatomini) é o vetor mais importante da Doença de Chagas em todo

o sudeste da América do Sul. Por ser uma espécie não autóctone do Brasil, o *T. infestans* era encontrado no peridomicílio e, principalmente, no interior de habitações, demonstrando preferência alimentar por sangue humano e de outros animais domésticos (Forattini et al., 1982). Esta espécie é originária da região dos Andes, em Cochabamba, na Bolívia. Acredita-se que, a partir desse foco originário, a espécie teria se dispersado, de forma passiva, por quase metade do continente sulamericano (Schofield e Dias, 1999; Pereira et al., 2006), chegando a ser encontrada na Argentina, Bolívia, Chile, Paraguai, Peru, Uruguai e Brasil. Atualmente, populações de *T. infestans* estão sendo eliminadas das regiões onde a espécie não é autóctone em consequência de extensas campanhas de controle vetorial como a Iniciativa dos Países do Cone Sul (Schofield et al., 2006).

Com a eliminação da transmissão da doença pelo *T. infestans* no Brasil, outras espécies, como *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, *Triatoma pseudomaculata* e *Panstrongylus megistus*, até então consideradas de menor importância epidemiológica, mas com capacidade suficiente para a manutenção do ciclo da doença, passaram a apresentar um papel mais relevante por serem encontradas habitando áreas peridomiciliares que foram desocupadas pelo *T. infestans* (Dias et al., 2002).

O *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Triatominae, Triatomini) é considerado também um vetor importante na transmissão da doença de Chagas no Brasil. Apresenta ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrado nos nove estados do nordeste (Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia), além dos Estados de Minas Gerais e Tocantins (Silveira et al., 1984). Embora seja uma espécie tipicamente silvestre, apresenta grande capacidade para colonização do domicílio e do peridomicílio, onde pode se alimentar de animais domésticos e do homem.

A espécie *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 (Triatominae, Rhodniini) é uma importante vetora da Doença de Chagas na América Central, como El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicarágua (Dias, 1952) e no Brasil, na região norte da Amazônia (Coura et al., 2002). Em países como Venezuela e Colômbia, *R. prolixus* apresenta caráter silvestre, habitando principalmente as copas de

palmeiras (Schofield, 1994) e em algumas áreas já pode ser encontrado bem estabelecido no intradomicílio (Lent e Wygodzinsky, 1979). Estudos populacionais mostraram que *R. prolixus* foi introduzido passivamente na América Central, onde é encontrado somente no interior dos domicílios (Schofield, 1994).

1.2. Importância farmacológica da saliva de artrópodes hematófagos

Para ingerir o sangue de maneira rápida e eficiente, os artrópodes hematófagos contam com a ajuda de sua saliva que possui inúmeras moléculas bioativas responsáveis por diversas atividades farmacológicas atuando no bloqueio ou na diminuição de diferentes reações do hospedeiro (Charlab et al., 1999; ^bRibeiro, 1987; Ribeiro, 1995; Ribeiro e Francischetti, 2003; Ribeiro e Garcia, 1981; Soares et al., 2006).

As principais atividades salivares já descritas estão relacionadas com a inibição de vários fatores da hemostasia do hospedeiro (Ribeiro e Francischetti, 2003; Andrade et al., 2005). Atualmente, são conhecidos vários componentes farmacológicos presentes na saliva dos triatomíneos com capacidade de interferirem na hemostasia, tais como, anticoagulantes (Hellmann e Hawkins, 1964; 1965; Ribeiro et al., 1995; Pereira et al., 1996; Araújo et al., 2006), vasodilatadores (Ribeiro et al., 1990; Ribeiro et al., 1993; Ribeiro e Nussenzweig, 1993) e inibidores de agregação plaquetária induzida por colágeno (Ribeiro e Garcia, 1981; Noeske-Jungblut et al., 1994), por ADP (Ribeiro e Garcia, 1981; Smith, 1980; Sarkis et al., 1986; Charlab et al., 1999), por ácido aracdônico (Ribeiro e Sarkis, 1982) e por trombina (Noeske-jungblut et al., 1995; Francischetti et al., 2000).

Além das atividades que interferem na hemostasia, há moléculas salivares biologicamente ativas capazes de atuar contra o sistema imune dos hospedeiros vertebrados, inibindo ou diminuindo as atividades do sistema imune inato e/ou adaptativo do hospedeiro (Kamhawi, 2000; Gillespie et al., 2000), em especial a atuação contra o sistema complemento (Cavalcante et al., 2003). Para os artrópodes hematófagos, uma modulação da resposta imunológica do hospedeiro

seria muito vantajosa, uma vez que possibilitaria sucessivos repastos sanguíneos em um mesmo hospedeiro (Schoeler e Wikel, 2001).

1.3 O sistema complemento humano

O sistema complemento é um componente muito importante da defesa imune. É composto por um conjunto de proteínas solúveis e proteínas expressas na superfície de membranas celulares. Responde prontamente a desafios por microrganismos, promovendo a sua opsonização e, ainda, promovendo a lise celular (Sim e Dodds, 1997).

A ativação do sistema complemento pode ocorrer por meio de três vias diferentes, as vias clássica, alternativa e da lectina, nas quais ocorrem clivagens proteolíticas sucessivas de alguns de seus componentes. Estas vias convergem para um caminho comum, formando o complexo de ataque à membrana (MAC) responsável pela lise celular (Sim e Dodds, 1997). Além de agir diretamente em microrganismos, o sistema complemento tem um papel importante no sistema imune adaptativo, contribuindo para o processamento e internalização de antígenos, tornando a resposta humoral muito mais eficiente (Barrington et al., 2001; Carroll, 2004; Villiers et al., 2008). A figura 1 mostra um esquema da cascata do sistema complemento.

1.3.1 A via Clássica

A via clássica é iniciada pela ligação do complexo C1, formado por C1q e pelas proteases C1r e C1s, aos anticorpos IgG ou IgM ligados à superfície de ativação, na presença de Ca^{+2} . A atividade proteolítica de C1r é ativada automaticamente através da interação com C1q. Posteriormente, C1s é ativada pela ação de C1r. Moléculas de C1s ativas agem em C4 e, posteriormente, em C2 ativando-os. Uma vez clivado, o fragmento C4b é capaz de ligar-se covalentemente à superfície de ativação, onde se liga ao componente C2, que

após a sua clivagem, irá compor a C3 convertase (C4b-C2a) (Sim e Laich, 2000; Sim e Dodds, 1997).

A C3 convertase da via clássica é responsável pela clivagem e ativação do componente C3 (na presença de Mg^{+2}), um componente comum às vias clássica e alternativa. A serino protease C2a, no complexo C4b-C2a, atua no componente C3, produzindo moléculas de C3b que são capazes de ligar-se, covalentemente, à superfície de ativação próxima ao local de ativação, constituindo a C5 convertase (C4b-C2a-C3b). Neste complexo enzimático, o componente C5 liga-se ao C4b e ao C3b, onde pode ser ativado por C2a, iniciando-se a formação do complexo de ataque à membrana (MAC), descrito mais adiante.

1.3.2 A via da Lectina

A ativação da via da lectina ocorre através de múltiplas interações fracas da proteína MBL (lectina ligante à manose) com resíduos de oligossacarídeos neutros, compostos por manose, N-acetilglicosamina ou fucose, presentes nas paredes celulares de várias espécies de microrganismos (Kawasaki et al., 1983; Sim e Laich, 2000). A proteína MBL é semelhante ao componente C1q, e assim como na via clássica, a MBL ligada à superfície ativadora interage com proteases homólogas a C1r e C1s, chamadas MASPs (MASP-1, MASP-2 e MASP-3). Esta associação é seguida pela clivagem de C4 (Thiel et al., 1997) e C2 (Vorup-Jensen et al., 2000), pela MASP-2. A partir da ativação de C4b e C2a, essa via é semelhante à via clássica. Os componentes exclusivos da via da lectina (MBL e MASPs) são muito menos abundantes na circulação que C1q, C1r e C1s e seu papel quantitativo na ativação do sistema complemento é de difícil avaliação.

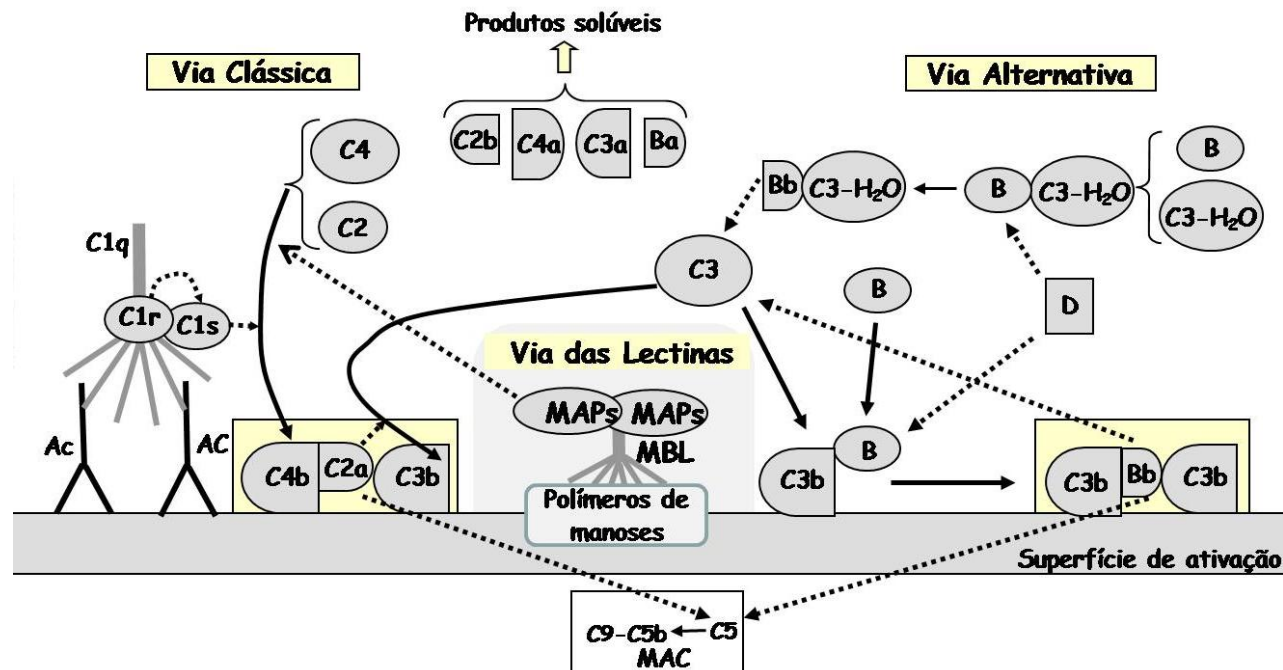


Figura 1: Esquema da fase de ativação do sistema complemento: A via clássica é iniciada pela ligação de C1q, C1r e C1s (complexo C1) à molécula de anticorpo (Ac) ligado à superfície de ativação. C1s, ativada por C1r, (Ativação proteolítica>) atua especificamente em C2 e C4, ativando-os. A ativação da via da lectina ocorre a partir da interação de polímeros de oligossacarídeos neutros (manose) presentes na superfície de ativação com lectina ligante à manose (MBL). Em seguida, moléculas conhecidas como MASPs atuam sobre C2 e C4, ativando-os de forma semelhante ao C1r e C1s. Em ambas as vias, o fragmento C4b, proveniente da clivagem de C4, é capaz de ligar-se, covalentemente, à superfície de ativação criando um sítio de ligação para C2a. O complexo C4b-C2a atua em C3, produzindo moléculas de C3b, as quais são capazes de ligar-se, covalentemente, à superfície próxima ao lugar de ativação. O complexo C4b-C2a-C3b atua em C5, gerando o complexo de ataque à membrana (MAC). Para a ativação da via alternativa, uma pequena fração de C3 presente no fluido extracelular passa por reações espontâneas com moléculas de H₂O, gerando C3b-H₂O. Estas moléculas podem interagir com o Fator B, gerando o complexo B-C3-H₂O. Após a clivagem do Fator B ligado no complexo, pelo Fator D, o complexo Bb-C3-H₂O age sobre C3, de forma que o C3b gerado liga-se, covalentemente, à superfície de ativação, produzindo C3 convertase. O complexo C3b-Bb-C3b atua sobre o C5, gerando o MAC.

1.3.3 A via Alternativa

Na via alternativa não há moléculas de reconhecimento definidas, como C1q e MBL. Para a ativação da via alternativa, uma fração pequena de C3 presente nos fluidos extracelulares lentamente sofre reação espontânea com moléculas de H₂O, gerando C3-H₂O. Estas moléculas podem interagir com a proteína B, formando o complexo B-C3-H₂O, em solução, que é um substrato para o fator D, uma serino protease plasmática. O complexo Bb-C3-H₂O age em C3, clivando-o em fragmentos menores, C3b e C3a. Muitas das moléculas de C3b geradas combinarão com H₂O ou outras moléculas, tornando-se inativas (Sim e Dodds, 1997).

Por outro lado, se uma dessas moléculas de C3b gerada se encontrar próxima a uma bactéria, ela poderá ligar-se covalentemente na sua superfície, proporcionando um sítio adequado para a ligação do fator B. O complexo C3b-B é, então, ativado pela protease fator D, gerando a C3 convertase da via alternativa (C3b-Bb), uma protease dependente da presença de Mg⁺² capaz de ativar eficientemente outras moléculas de C3 (Volanakis e Narayana, 1996). Com a adição de novo fragmento C3b ao complexo, ocorrerá à formação da C5 convertase (C3b-Bb-C3b), que poderá dar início a formação do MAC (Sim e Dodds, 1997).

1.3.4 Complexo de Ataque à Membrana (MAC)

O complexo ataque à membrana é formado pelos componentes do complemento C5b-C9, os quais estão envolvidos na formação de poros na bicamada lipídica, podendo causar a lise celular. A montagem do MAC dá-se após a clivagem de C5, em C5a e C5b, realizada pela C5 convertase, na qual o fragmento C5b se liga. Uma vez ocorrida à ligação de C6 e C7, o complexo C5b-C7 sofre uma mudança conformacional, que passa a apresentar regiões hidrofóbicas, desprendendo-se da convertase e ligando-se à membrana. A vida média de C5b-7 na fase fluida é muito curta e os complexos que não encontram uma membrana para se fixarem sofrem rápida hidrólise ou são inativados por

reguladores solúveis (Sim e Dodds, 1997; Hãnsch, 1988). O complexo C5b-C7 fixado à membrana não causa, então, danos à célula, pois não está inserido profundamente na bicamada lipídica. Com a ligação de C8, formam-se pequenos poros através da membrana, desestabilizando-a. A lise osmótica só ocorre, efetivamente, após a ligação de vários monômeros de C9 ao complexo, os quais aumentam o diâmetro dos poros, levando ao rompimento celular.

1.3.5 Anafilatoxinas

Pequenos fragmentos biologicamente ativos produzidos pelo sistema complemento, como C3a, C4a e C5a, que apresentam importante papel na defesa imune, mediando interações entre o sistema imune inato e o adaptativo. Eles estimulam a quimiotaxia de diferentes células de defesa, tais como, neutrófilos, eosinófilos e leucócitos e podem ativar os basófilos e mastócitos (Gorski et al., 1979; Baldwin et al., 1995; DiScipio e Schraufstatter, 2007).

1.3.6 Proteínas reguladoras

Cada etapa do sistema complemento é controlada por proteínas reguladoras solúveis ou presentes na superfície de diferentes células do hospedeiro que impedem que estas sejam atacadas. Sem este controle, ocorreria um rápido consumo e uma amplificação desordenada dos componentes do complemento, podendo levar a lesão das células do próprio hospedeiro.

Na via clássica, o primeiro inibidor que pode ser solicitado para inibir o complexo C1 é o inibidor C1 (C1inh). Ele atua sobre o complexo C1, dissociando irreversivelmente os componentes C1r e C1s do componente C1q. Desta forma, o C1inh inibe a atividade proteolítica do complexo C1 sobre C2 e C4 (Agostoni, 1989).

A maioria das proteínas reguladoras atua sobre as C3 e C5 convertases. Estas convertases podem ser controladas por proteínas reguladoras que se ligam às convertases, acelerando a dissociação de C2a ou Bb (Sim e Dodds, 1997).

O Fator I é uma protease plasmática que na presença de cofatores específicos, inativa C3b e C4b presentes nas convertases. Há duas proteínas plasmáticas que atuam como cofatores: fator H e a proteína ligante ao C4b (C4bp). Quando os componentes C3b e C4b das convertases ligam-se ao Fator H e C4bp, respectivamente, o Fator I atua sobre esses componentes, inativando-os. Neste caso, os fatores H e C4bp somente se ligam às convertases que se formam indevidamente sobre a superfície de células do organismo. Eles reconhecem resíduos de ácido siálico presentes em todas as células do organismo quando estes estão na vizinhança das convertase. Existem também proteínas presentes na superfície de membranas que atuam como cofatores para a clivagem de C3b e C4b, que fazem parte das convertases, pelo Fator I: a proteína cofatora de membrana (MCP) e o receptor 1 do complemento (CR1). Além de atuar como cofator, o CR1 também atua no decaimento de C2a e Bb presentes nas convertases (Sim, Dodds, 1997; Sim e Laich, 2000; Sim e Tsiftoglou, 2004).

O fator acelerador de decaimento (DAF), uma proteína de membrana, atua somente no decaimento das convertases. Assim como CR1, este fator acelera a dissociação de C2a e Bb dos seus respectivos complexos (Sim e Dodds, 1997).

Outro caminho onde as proteínas reguladoras poderiam atuar seria na formação do complexo ataque à membrana (MAC). Eventualmente, o MAC pode se inserir na superfície de células saudáveis do próprio organismo. Neste contexto, as proteínas reguladoras podem impedir a formação do MAC. Para exercer tal ação, existem as proteínas plasmáticas, vitronectina (proteína S) e Clusterina (SP-40,40) que se ligam ao C5-7, impedindo que estes se insiram na membrana (Hänsch, 1988); e as proteínas de membrana, CD59 e o fator de restrição homóloga (HRF) que se ligam ao complexo C5b-8, impedindo a ligação de C9 à superfície da membrana, além de impedir a ligação de outros componentes C9 ao complexo (Morgan e Harris, 1999).

Entre as proteínas reguladoras do sistema complemento, podemos encontrar aquelas que atuam positivamente neste controle. É o caso da Properdina, uma proteína plasmática que atua somente na via alternativa. Ela se liga as C3 e C5 convertases, promovendo maior estabilidade destes complexos (Sim e Dodds, 1997).

1.4 O papel de inibidores do complemento presentes na saliva e no intestino de artrópodes hematófagos

A capacidade da saliva de artrópodes hematófagos de interferir no sistema complemento foi descrita, primeiramente, em carrapatos do gênero *Ixodes*. A saliva destes artrópodes mostrou-se capaz de inibir a via alternativa do sistema complemento embora não pudesse interferir na via clássica (^aRibeiro, 1987).

Cavalcante et al. (2003) mostraram que a saliva de fêmeas de *Triatoma brasiliensis*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* é capaz de inibir a via clássica do sistema complemento. Ainda neste trabalho, a saliva de outros artrópodes foi testada e observaram que a saliva de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) é capaz de inibir o sistema complemento humano atuando tanto sobre a via clássica quanto sobre a via alternativa, enquanto que a saliva de *L. migonei* (Diptera: Psychodidae) é capaz de inibir apenas a via clássica. Curiosamente, a saliva de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) não apresentou capacidade inibidora da via clássica do sistema complemento.

A presença de atividade anti-complemento na saliva de artrópodes hematófagos, filogeneticamente distintos, sugere que os inibidores do sistema complemento podem ter um importante papel para estes organismos. Estes inibidores salivares poderiam estar envolvidos na proteção de células do trato digestivo contra o ataque do sistema complemento após o repasto sanguíneo. De acordo com esta hipótese, artrópodes hematófagos como, *A. aegypti* e *C. felis*, os quais não possuem inibidores salivares, poderiam inibir o complemento ao nível do trato digestivo, compensando, desta forma, a falta destes inibidores na saliva.

Além de atuar na proteção do tubo digestivo, os inibidores do sistema complemento presentes na saliva dos insetos hematófagos poderiam também atuar na redução das reações inflamatórias no local da picada, contribuindo desta forma para que a percepção do inseto pelo hospedeiro diminua.

Neste contexto, a caracterização de moléculas inibidoras do complemento dos triatomíneos poderia acrescentar informações importantes para melhor compreensão da biologia de seus vetores e também da doença de Chagas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar a atividade inibidora do sistema complemento humano presente na saliva e no intestino dos triatomíneos: *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*, bem como investigar o papel fisiológico dessas moléculas.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o papel fisiológico da atividade inibidora do complemento no intestino dos triatomíneos;
- Avaliar a influência do pH no funcionamento do sistema complemento humano no intestino médio anterior de *T. brasiliensis*;
- Investigar se a saliva e o conteúdo intestinal solúvel de *T. brasiliensis*, *T. infestans* e *R. prolixus* inibem as vias clássica e alternativa do sistema complemento;
- Determinar os pontos da cascata do sistema complemento afetados pelos inibidores presentes na saliva e no conteúdo intestinal solúvel de *T. brasiliensis*, *T. infestans* e *R. prolixus*;
- Investigar se o homogenato de microvilosidades intestinais e membranas perimicrovilares de *T. brasiliensis*, *T. infestans* e *R. prolixus* inibe a via clássica do sistema complemento humano;

- Investigar se a hemolinfa dos triatomíneos estudados apresenta inibidores do sistema complemento humano;
- Conferir a existência de inibidores das vias clássica e alternativa do sistema complemento humano em outro modelo de inseto vetor (*Aedes aegypti*).

3. METODOLOGIA

3.1 Origem e manutenção dos insetos

Foram utilizadas ninfas de 4º estágio de *Triatoma brasiliensis*, *T. infestans* e *Rhodnius prolixus*, com jejum de 10 a 20 dias após a muda, mantidas em colônias no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH) do Departamento de Parasitologia, ICB/ UFMG.

Os triatomíneos foram criados em insetário climatizado, sob condições semi-controladas (temperatura média de 28°C; umidade relativa de 65%), em recipientes cilíndricos de acrílico, forrados com papel filtro e contendo uma tira de cartolina, dobrada em sanfona, para o aumento da superfície interna. Os potes eram tampados com tecido fino de algodão para permitir o repasto sanguíneo dos insetos que era realizado, a cada sete dias, em ratos e galinhas, alternadamente.

Também foram utilizadas fêmeas de *Aedes aegypti* não alimentadas com sangue com idade superior a sete dias que eram mantidas de acordo com o protocolo Eiras e Jepson (1991), em colônia fechada, a 27°C e umidade relativa do ar em torno de 70%.

3.2 Obtenção de extrato de glândula salivar de triatomíneos

A saliva dos triatomíneos do gênero *Triatoma* é distribuída em três compartimentos conhecidos como D1, D2 e D3 (Baptist, 1941). Em experimentos-piloto, foi observada a ausência de atividade anti-complemento no glóbulo D3 e por esta razão todos os experimentos realizados para avaliar a atividade inibidora do sistema complemento na saliva dos triatomíneos foram executados apenas com os glóbulos D1 e D2. Assim, quando nos referirmos a “um glóbulo salivar”, estamos nos referindo ao conjunto de “D1 e D2”. Em *R. prolixus*, a saliva é contida em um compartimento principal equivalente aos glóbulos D1 e D2 de *Triatoma* e um outro compartimento acessório menor, equivalente ao D3 (Baptist, 1941), os quais foram utilizados nos ensaios anti-complemento (Fig. 2).

Doze glóbulos salivares de cada espécie foram dissecados em solução salina 0,9%, com o auxílio de pinças especiais para dissecação de insetos, sob um microscópio estereoscópico. Após a dissecação, os glóbulos salivares foram lavados cuidadosamente para não serem rompidos, com o intuito de retirar possíveis contaminações com moléculas da hemolinfa dos triatomíneos. Posteriormente, aos mesmos foram adicionados 480µL de solução **HMEBN** (HEPES 5mM; MgCl₂ 7mM; EGTA 10mM; BSA 5mg/mL; NaCl 140mM, pH 7,4) para ensaio da via alternativa ou de solução **HNCM** (HEPES 4mM; NaCl 145mM; CaCl₂ 2mM; MgCl₂ 1mM, pH 7,4) para ensaio da via clássica. Em seguida, as glândulas eram sonicadas por 5 segundos em um sonicador de banho (Branson® 1510) e centrifugadas a 10000g por 3 minutos, à temperatura ambiente. Este material era mantido em banho de gelo durante todo o período precedente ao ensaio. Somente o sobrenadante era utilizado nos ensaios, numa diluição ajustada para o equivalente a 2, 1 e 0,5 glóbulos salivares.

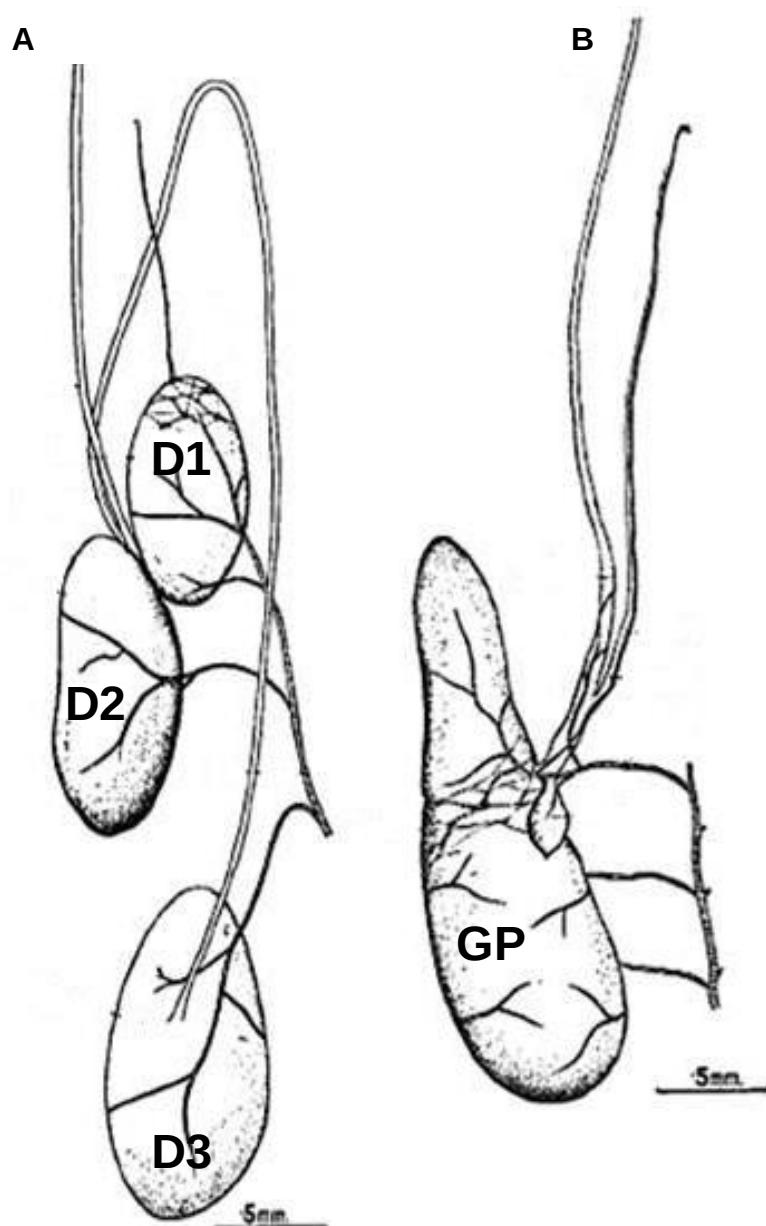


Figura 2: Glândulas salivares de *Triatoma infestans* (A) e *Rhodnius prolixus* (B) (Baptist, 1941). D1: glóbulo posterior da glândula principal; D2: glóbulo anterior da glândula principal; D3: glóbulo acessório; GP: glândula principal.

3.3 Obtenção do conteúdo intestinal dos insetos em estudo

Seis intestinos médio-anterior (crop) de cada espécie eram dissecados de ninfas de 4^o estágio de *T. brasiliensis*, *T. infestans* ou *R. prolixus*, em solução salina 0,9%, sob um microscópio estereoscópico, com auxílio de pinças e microtesoura especiais para dissecação de insetos. Após a dissecação, os intestinos íntegros foram lavados, cuidadosamente, com solução salina 0,9% para retirar possíveis contaminações com a hemolinfa. Os intestinos eram rasgados e o conteúdo centrifugado a 10 000g por 3 minutos.

Vinte intestinos médio-anterior de fêmeas de *A. aegypti* eram dissecados e, posteriormente, rasgados com auxílio de pinças e estiletes. Após sonicar por 10 segundos, o material dissecado era centrifugado a 10 000g, por 3 minutos, à temperatura ambiente.

Após a centrifugação do conteúdo intestinal dos insetos, os volumes obtidos eram ajustados para 480µL com solução HMEBN ou HNCM e mantidos em banho de gelo durante todo o período precedente aos ensaios. Quantidades ajustadas do conteúdo intestinal solúvel para o equivalente a 1, 0,5, 0,25 intestino médio anterior) eram utilizadas nos ensaios de atividade inibidora do complemento.

3.4 Obtenção de soro humano

O soro humano foi obtido a partir de sangue de no mínimo 6 voluntários saudáveis. Após a coleta, o sangue foi deixado, à temperatura ambiente, por 4 horas antes de ser centrifugado a 500g. Após a remoção do soro de todos os voluntários, os mesmos foram misturados, aliquotados em volumes de 400µL e estocados a -80°C até o uso.

3.5 Obtenção do homogenato de membranas perimicrovilares e microvilosidades intestinais de triatomíneos (Abdul-Rauf e Ellar, 1999)

Preparações contendo uma mistura de microvilosidades intestinais e membranas perimicrovilares foram obtidas a partir do intestino médio anterior de seis triatomíneos de cada espécie. Os intestinos eram dissecados conforme descrito anteriormente e o conteúdo intestinal era lavado totalmente com salina 0,9%. Posteriormente, os intestinos eram então transferidos para 600µL de solução MET gelada (Manitol 300mM, EGTA 5mM e Tris/HCl 17mM, pH 7,5) em um tubo de microcentrífuga e, manualmente, homogeneizados com o auxílio de um micro-homogeneizador de vidro abrasivo, durante 5 minutos. A esta preparação eram misturados 100µL de MgCl₂ 24mM gelado. Após 20 minutos em banho de gelo, o material era centrifugado, a 2500g, por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante era coletado em um tubo a parte e o sedimento formado era novamente homogeneizado em 100µL de solução MET gelada e centrifugado nas mesmas condições. Após repetir este procedimento por uma terceira vez, os sobrenadantes eram reunidos e centrifugados a 25 000 g, por 30 minutos, a 4°C. O sedimento obtido era dissolvido em HNCM contendo o detergente desoxicolato de sódio a 0,025% e usado somente em ensaios de inibição da via clássica.

3.6 Obtenção de hemolinfa de triatomíneos

A hemolinfa obtida de pelo menos 3 ninfas de 4º estágio, de cada uma das três espécies, foi coletada a partir do seccionamento da coxa de uma das pernas. Doze microlitros de hemolinfa coletados com uma pipeta eram centrifugados a 10000g, por 3 minutos, à temperatura ambiente, e os volumes ajustados para 480µL com solução HMEBN ou HNCM. Quantidades adequadas (2 e 1µL de hemolinfa) eram utilizadas nos ensaios de atividade inibidora do complemento. O sobrenadante era mantido em banho de gelo durante todo o período anterior aos ensaios de atividade inibidora do complemento.

3.7 Estudo do papel fisiológico dos inibidores do complemento na proteção do trato digestivo

O papel dos inibidores do complemento na proteção do tubo digestivo foi investigado em condições nas quais o inseto não podia contar com uma proteção plena dos inibidores e assim o epitélio era atacado. Nesses ensaios, a formação do MAC sobre a membrana das células epiteliais foi evidenciada por imunofluorescência. O estudo foi feito forçando ninfas de 4º estágio de *T. brasiliensis* a ingerirem soro humano com um aparato, desenvolvido por nós e mostrado na Figura 3.

Um tubo de plástico de aproximadamente 0,5cm de comprimento e diâmetro interno de 0,58mm foi inserido na cabeça das ninfas (com a probóscida esticada e as antenas cortadas) e colado ao inseto com cola Super Bonder® a base de cianoacrilato. Anteriormente a conexão da agulha à seringa, o aparato foi preenchido com o material que o inseto deveria ingerir, evitando, desta forma, a formação de bolhas de ar. Com o uso deste aparato foi possível injetar 50µL de soro normal ou o mesmo volume de soro 2X concentrado ou de soro 2X concentrado inativado (30 minutos, a 56°C) no interior do trato digestivo.

O soro foi concentrado em uma centrífuga evaporadora. Após a injeção de cada um dos materiais, o inseto foi deixado em repouso por 60 minutos e então dissecado para retirada do intestino médio anterior. O intestino médio anterior foi então delicadamente aberto com estilete, lavado 5 vezes em PBS e incubado por 20 minutos com anticorpo de coelho anti-C5b-C9 humano (Calbiochem: 204903) (8,3mg/ml), diluído a 1:500 em HNB, pH 7,4. Terminada esta incubação, o intestino médio anterior era lavado 5 vezes em PBS e incubado com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fluoresceína (Calbiochem: 401319) 1:1000 em HNB (pH 7,4), por 20 minutos. Depois de nova sessão de lavagens, a deposição do MAC sobre a superfície interna do intestino foi examinada em um microscópio de epifluorescência (450-490 nm excitação/ 535 nm emissão). Como controle, alguns insetos foram submetidos às mesmas lavagens e ao mesmo tratamento com os anticorpos após terem tomado um repasto sanguíneo normal

em voluntários humanos. Uma vez que os insetos apresentam alguma fluorescência natural, o intestino médio anterior de algumas ninfas foi lavado em PBS e levado ao microscópio para servir de controle.

Outro experimento para verificar o papel dos inibidores do complemento no intestino dos triatomíneos foi realizado utilizando o corante fluorescente iodeto de propídeo (IP) (Darzynkiewicz et al., 1995). O iodeto de propídeo foi utilizado para avaliar a morte de células epiteliais expostas ao complemento presente no soro humano duas vezes concentrado. Este corante penetra em células mortas e torna os seus núcleos fluorescentes. As ninfas foram obrigadas a ingerir 50µL de soro humano concentrado 2 vezes contendo 2,5µg/mL de IP (Fig. 3). Após 60 minutos de repouso, o intestino médio anterior foi dissecado e levado sem ser rompido ao microscópio de epifluorescência (510-560nm excitação/590nm emissão). A fluorescência foi comparada com insetos que ingeriram soro humano 2 vezes concentrado e inativado por 30 minutos, a 56°C.

3.8 Avaliação da ingestão salivar durante o procedimento da alimentação forçada (Baginski et al., 1967)

Para certificar-nos de que não houve ingestão considerável de saliva pelos insetos durante o procedimento de alimentação forçada e que os insetos contariam apenas com a proteção proveniente do intestino contra o sistema complemento, a atividade da apirase, uma enzima salivar que pode servir de marcador, foi medida no intestino médio anterior dos triatomíneos. Para tal, foram testados três grupos de ninfas de 4º estágio: o primeiro grupo foi formado por ninfas após a alimentação forçada com salina 0,9%; o segundo, por ninfas após a alimentação natural em alimentador artificial contendo salina 0,9% e o terceiro grupo foi formado por ninfas de 4º estágio não alimentadas. Após os tratamentos, o conteúdo intestinal solúvel proveniente do intestino médio anterior foi transferido para tubo de microcentrífuga, em banho de gelo, contendo 30µL de uma solução tampão HEPES 20mM/NaCl 100mM, pH 7,4. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 12 000g, por 3 minutos e o sobrenadante obtido foi transferido

para novo tubo. Para o ensaio da apirase, um volume correspondendo a 1/12 da amostra foi misturado a uma solução tampão HEPES 20mM/NaCl 100mM (pH 7,4) até um volume final de 20 μ L. A esta mistura de 20 μ L, foram adicionados 80 μ L de HEPES 20mM/NaCl 100mM (pH 7,4) contendo ATP 4mM e CaCl₂ 5mM e o tubo foi imediatamente incubado a 37°C por 25 minutos. Após incubação, o fosfato inorgânico liberado do ATP foi imediatamente medido usando um Kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil). O fosfato encontrado em ninfas não alimentadas foi subtraído da medida obtida em ninfas alimentadas de maneira natural ou forçada. A atividade da apirase foi expressa em nanogramas de fosfato inorgânico liberados por minuto.

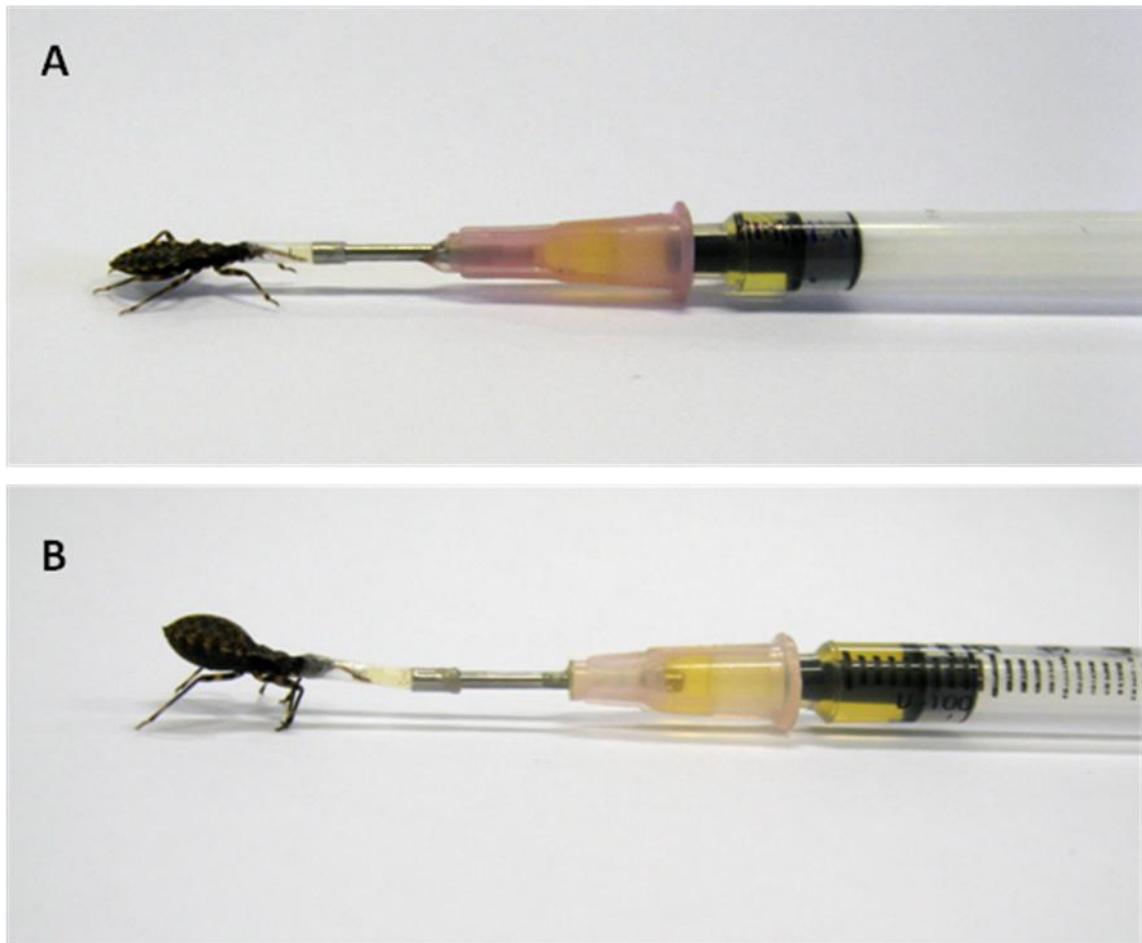


Figura 3: Aparato usado para alimentação forçada em ninfas de 4º estágio de *T. brasiliensis*:

Um tubo de plástico foi inserido na cabeça das ninfas (com a probóscida esticada e as antenas cortadas) e colado ao inseto com cola Super Bonder® a base de cianoacrilato para evitar o vazamento do material a ser ingerido. A) aparato acoplado à ninfa antes da ingestão forçada ser executada; B) aparato acoplado à ninfa após ingestão forçada de 50µL de soro humano.

3.9 Determinação do pH do intestino médio anterior de *T. brasiliensis*

O pH do intestino médio-anterior de *T. brasiliensis* foi determinado com o uso de microeletrodos sensíveis ao íon H^+ , de acordo com a metodologia utilizada por Santos et al. (2008), descrita resumidamente a seguir.

A partir de capilares de vidro estirados através de uma microforja, foram construídas micropipetas suficientemente finas para serem introduzidas no intestino médio anterior de triatomíneos. Estas micropipetas foram utilizadas para a confecção de dois tipos de microeletrodos: um microeletrodo de referência e um microeletrodo condutor de íons H^+ .

As micropipetas utilizadas como microeletrodo de referência receberam na ponta 0,5 μ L de solução de agarose 0,2% em KCl 3M. Após a gelificação da agarose, estas micropipetas foram preenchidas com KCl 3M. As micropipetas utilizadas como microeletrodo condutores de íons H^+ receberam na ponta de 1 a 2 μ L de uma mistura contendo 3 μ L de ionóforo para H^+ coquetel A (Fluka®) com 7 μ L de uma solução de cloreto de polivinil (PVC) 0,075% dissolvido em tetrahidrofurano. Em seguida, este microeletrodo condutor de íon H^+ era inserido em um dessecador a vácuo, durante sete dias, para que o solvente tetrahidrofurano evaporasse. Após a evaporação do solvente, o PVC formava uma camada porosa e resistente o suficiente para manter o ionóforo na ponta da micropipeta. Momentos anteriores ao ensaio, essas micropipetas eram preenchidas com tampão MES/TRIS base 0,1M e KCl 0,1M ajustado em pH 4,3. Ambos os microeletrodos foram conectados por meio de fios de prata cloretada (Ag-AgCl) a um aparelho que mede diferença de potencial (voltagem). Em seguida, os microeletrodos eram calibrados nos pHs 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5, utilizando soluções-tampão que funcionavam como padrões de pH conhecidos (fosfato de potássio monobásico/NaOH pH 7,0 e 7,5; TRIS base/HCl pH 8,0 e 8,5). Com os dados obtidos, foi construída uma curva de calibração, interpolando o pH da solução padrão com a diferença de potencial alcançada em cada caso, através de regressão linear.

Para medir o pH do intestino médio anterior, ninfas de 4º estágio de *T. brasiliensis* foram alimentadas previamente em camundongos anestesiados, intraperitonealmente, com uma mistura de Ketamina (Cristalia® - Brasil) e Xilazina (Bayer® - Brasil), 150mg/Kg e 10mg/Kg, respectivamente, diluídos em solução salina 0,9%. A medição foi realizada em seis ninfas recém alimentadas (até duas horas após repasto sanguíneo) e em três ninfas, 24 horas após o repasto. Após o repasto sanguíneo, cada ninfa foi imobilizada em uma fita adesiva de dupla face fixada num suporte. Sob microscópio estereoscópico, foi introduzido um par de eletrodos (de referência e sensíveis ao íon H^+) na cutícula abdominal de cada ninfa, com o auxílio de micromanipuladores até que elas alcançassem o intestino médio anterior cheio de sangue. As leituras foram anotadas manualmente e os valores medidos em milivolts foram transformados em unidades de pH, através das respectivas curvas de calibração.

3.10 Estudo da influência do pH no funcionamento do sistema complemento humano

O sistema complemento humano funciona normalmente no pH 7,4, o pH normal dos fluidos corporais. Em algumas espécies hematófagas, o pH do sangue ingerido sofre modificações. Por exemplo, o pH do sangue ingerido por mosquitos (del Pilar Corena et al., 2005) e por flebotomíneos sofre alcalinização. No caso dos flebotomíneos o pH chega a subir para pH 8,15 (Santos et al., 2008). O pH do sangue armazenado no intestino médio anterior de triatomíneos era desconhecido até o momento da execução deste trabalho. Assim, foi necessário medi-lo como está explicado no item anterior. Levando em conta que o pH do sangue ingerido pudesse ser diferente de pH 7,4 nos triatomíneos, tornou-se necessário saber se neste novo pH o sistema permanecia funcional. É importante ressaltar que a inibição do sistema complemento só seria necessária se ele fosse funcional no novo pH. Desta forma, a eficiência do sistema complemento em diferentes pHs foi comparada com a eficiência observada no pH normal (pH 7,4). Esses ensaios foram feitos nos pHs de 6,0 a 8,5 em intervalos de 0,5 unidade de pH.

Para fazer este estudo, as técnicas aqui descritas para os ensaios das vias alternativa e clássica foram ligeiramente modificadas. Os soros foram misturados em tubos de microcentrífuga com tampões HMEBN ou HNCM com os valores ajustados conforme o pH a ser ensaiado (pHs 6,0 a 8,5). Nestes experimentos não se acrescentava os inibidores e o funcionamento do sistema complemento foi acompanhado pela medida da deposição de C3b. As leituras obtidas nos ensaios em diferentes pHs foram comparadas com as obtidas no pH 7,4.

3.11 Ensaio da atividade inibidora da via alternativa do sistema complemento humano (modificado de ^aRibeiro et al., 1987)

Os poços de uma microplaca de ELISA (COSTAR[®] código 9017) foram recobertos com agarose (Promega) a 0,1% dissolvida a quente, em água destilada (100µL/poço) e secados a 37°C por 12 horas. Dez microlitros de soro humano normal foram pré-misturados dentro de tubos de microcentrífuga, imediatamente antes dos ensaios com quantias ajustadas das amostras contendo os inibidores (extrato de glândula salivar, conteúdo intestinal ou hemolinfa). O volume final foi ajustado para 100µL com HMEBN. Os controles foram preparados em tubos de microcentrífuga, separadamente, contendo apenas o soro humano e a solução de HMEBN. Cada um destes tratamentos foi executado em triplicata. Os 100µL de cada preparação foram então transferidos para os poços da microplaca contendo agarose e a placa foi incubada a 37°C por 30 minutos, sob agitação (aproximadamente 80 rpm). Sob estas condições, a via alternativa é ativada e o componente C3b liga-se, covalentemente, à superfície da agarose em um nível variado, dependendo da ausência ou presença de qualquer inibidor. Após a incubação, a microplaca era lavada para a retirada dos componentes do complemento não aderidos. As lavagens foram executadas 3 vezes, durante 3 minutos, com 200µL de HMEBN, sob agitação (aproximadamente 80 rpm). A detecção de C3b foi realizada com 50µL de anticorpos de coelho anti-C3b humano (Sigma: C-025) 12,6µg/µL, diluídos a 1:1000 em HNB (HEPES/NaOH 10mM; NaCl 140mM; BSA 1mg/mL, pH 7,4). A incubação com o anticorpo foi realizada à temperatura ambiente, por 30 minutos, sob agitação. Os anticorpos

não aderidos foram lavados com HMEBN como descrito acima. Para detectar os anticorpos de coelho anti-C3b humano, cada poço era subsequentemente incubado com 50µL de anticorpo de camundongo anti-anticorpo de coelho conjugado com peroxidase (Sigma: A2074) diluídos a 1:1500 em HNB, durante 30 minutos, sob agitação. Após nova lavagem, os poços eram rapidamente preenchidos com 200µL do substrato OPD-H₂O₂ (1 mg/mL O-Phenylene-Diamine [Sigma: P-9029]) dissolvido em tampão citrato de sódio/HCl a 50mM, contendo H₂O₂ a 0,075%, no pH 5,5). As leituras foram executadas a 450nm em um leitor de microplaca (Bio-Rad Benchmark, software Microplate Gerente 5.2, 2002) a cada 30 segundos, durante 5 minutos (modo cinético), à temperatura ambiente. A velocidade máxima (isto é, a taxa de aumento de absorbância) foi calculada a partir dos dados brutos, pelo software Microplate Gerente 5.2 (2002), e os dados gerados foram utilizados para cálculos estatísticos, através dos testes ANOVA e T-student (software GraphPad InStat 3.0). Após a análise estatística, os dados foram transformados em porcentagem para melhor visualização.

3.12 Ensaio da atividade inibidora da via clássica do sistema complemento

humano (modificado de Petersen et al., 2001)

Uma microplaca de ELISA (COSTAR® código 9017) foi sensibilizada durante 12 horas, à temperatura ambiente, dentro de uma câmara úmida, com 2µg de IgG humano purificado em 50µL de tampão carbonato/bicarbonato de sódio (Na₂CO₃ 15mM, NaHCO₃ 35mM, pH 9,6).

Os poços sensibilizados foram bloqueados com 200µL de solução de LTN (0.1% leite em pó sem gordura em tampão TRIS-base/HCl a 10mM e NaCl 140mM, pH 7,4) durante 30 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação. Os poços foram bloqueados, uma segunda vez, nas mesmas condições, com solução de LTNTC (0.1% leite em pó sem gordura em tampão TRIS-base/HCl 10mM, NaCl 140mM, CaCl₂ 5mM e 0,05% de Tween-20, pH 7,4).

Um microlitro de soro humano normal foi pré-misturado dentro de tubos de microcentrífuga, imediatamente antes dos ensaios, a quantias ajustadas das

amostras que contêm os inibidores (extrato de glândula salivar, conteúdo intestinal, hemolinfa ou preparação de microvilosidades e membrana perimicrovilar intestinais). O volume final foi ajustado para 100µL com HNCM. O controle foi preparado em tubos, separadamente, contendo apenas soro e solução de HNCM. Cada um destes tratamentos foi realizado em triplicata. Cada 100µL da preparação foi então transferido para os poços sensibilizados com IgG humano e incubados por 30 minutos, a 37°C, sob agitação. Após a incubação, cada poço foi lavado com 200µL de HNCM, como descrito acima.

A detecção de C4b e de C3b foi realizada com anticorpos de coelho anti-C4b humano (5,9µg/µL) (SIGMA:C3402) ou anti-C3b humano (12,6µg/µL) respectivamente. A detecção do componente C1q foi executada com anticorpos de cabra anti-C1q humano (33µg/µL) (SIGMA:C3900). Os anticorpos anti-C4b e C3b foram diluídos a 1:1000 em solução NH¹ (HEPES/NaOH 10mM, NaCl 140mM, pH 7,4). O anticorpo anti-C1q foi diluído a 1:1000 em solução NH² (HEPES/NaOH 10mM, NaCl 860mM, pH 7,4). Cinquenta microlitros de cada anticorpo diluído foram transferidos para os respectivos poços e incubados por 30 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação. Os anticorpos não aderidos foram lavados com 200µL de HNCM, conforme descrito acima. Para a detecção dos anticorpos de coelho anti-C4b e anti-C3b, cada poço foi incubado por 30 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação, com 50µL de anticorpos monoclonais de camundongo anti-anticorpo de coelho conjugado com peroxidase (SIGMA:A2074) diluídos a 1:1500 em solução HN¹. Para a detecção do anticorpo anti-C1q foi realizado o mesmo procedimento, adicionando 50µL de anticorpos de coelho anti-anticorpo de cabra conjugado com peroxidase (CALBIOCHEM: 401504) na mesma diluição. As leituras e posterior análise estatística foram realizadas conforme descrito no ensaio da via alternativa.

3.12.1 Purificação de IgG total humano (Catty e Raykundalia, 1989)

A purificação de IgG total humano foi obtida através da afinidade por Proteína A Sepharose. Para cada mL de uma mistura de soro humano obtido de voluntários foram misturados nove mL de tampão TRIS-base/HCl 1M, pH 8,0. A

esta mistura, foram adicionados 10mL de solução saturada de sulfato de amônio (aproximadamente 1mg/mL), gota a gota, sob agitação. Após todo o sulfato de amônio ter sido adicionado, a mistura foi mantida em agitação suave, por uma hora, à temperatura ambiente. Depois de centrifugar a preparação a 10 000g, por 20 minutos, a 2°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com uma mistura de tampão TRIS base/HCl 1M (pH 8,0) e de sulfato de amônio saturado na mesma proporção usada anteriormente. Após nova centrifugação e descarte do sobrenadante, as proteínas precipitadas eram dissolvidas em 1mL de tampão fosfato de sódio 0,02M (pH 7,0). O material solubilizado foi cromatografado em SEPHADEX G25 equilibrado em tampão fosfato de sódio 0,02M (pH 7,0), para desalinização. Após esta etapa, as amostras selecionadas foram agrupadas e diluídas seis vezes com NaCl 1M para evitar a copurificação de C1q humano juntamente com os anticorpos (Burton et al., 1980; Petersen et al., 2001).

Os anticorpos foram então cromatografados em Proteína A Sepharose, resina capaz de se ligar especificamente, a moléculas de IgG. Para tanto, a coluna de Proteína A Sepharose foi previamente equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,02M (pH 7,0). Após a ligação dos anticorpos à resina e a lavagem das impurezas não ligadas, as moléculas de IgG foram eluídas com tampão ácido cítrico/NaOH 0,1M (pH 3,0) e coletadas em tubos de microcentrífuga contendo um volume de 140µL de TRIS base/HCl 1M (pH 9,0), até que o volume de cada tubo chegasse a um total de 500µL. Nesta condição, o pH da solução, contendo os anticorpos purificados, era corrigido para pH 7,4.

Os anticorpos purificados foram concentrados por ultrafiltração em ultrafiltro (VIVASPIN 20 ultrafilter, Aldrich código Z614599-48EA) com limite de exclusão de 5kDa por meio de centrifugação a 8000g, durante 2 horas, a 4°C. Após determinação espectrofotométrica da concentração da proteína (Groves et al., 1968), o material foi alíquotado e guardado a -80°C.

3.13 Determinação da presença de inibidores de baixo peso molecular no conteúdo intestinal de *T. infestans* e *T. brasiliensis*

Vinte e um intestinos de *T. infestans* e de *T. brasiliensis* foram dissecados conforme o protocolo no item 3.3. O volume do conteúdo intestinal obtido foi ajustado para 840µL com solução HMEBN ou HNCM. Esta mistura, então, foi filtrada em ultrafiltros, cujos limites de exclusão foram de 30 (SIGMA: M0536-25EA), 10 (SIGMA: M0411-25EA) e 5kDa (SIGMA: M0286-25EA), em ultrafiltrações sequenciais. O material ultrafiltrado foi mantido no gelo todo período precedente aos ensaios das vias do sistema complemento.

4. RESULTADOS

4.1 Estudo do papel fisiológico dos inibidores do complemento na proteção do trato digestivo

O papel dos inibidores do complemento na proteção do tubo digestivo foi observado em condições nas quais a atividade dos inibidores foi incompleta e, portanto, insuficiente para proteger o tubo digestivo da deposição do MAC. Nestes ensaios, a presença do MAC na membrana do epitélio intestinal foi evidenciada por imunofluorescência. Quando a alimentação forçada foi aplicada praticamente nenhuma saliva foi ingerida juntamente com o soro. Esta ausência da saliva no intestino das ninfas, durante a alimentação forçada, foi confirmada pelo uso da enzima salivar apirase como um marcador salivar (Fig. 4). Desta forma, os insetos teriam apenas os inibidores intestinais para protegê-los contra o complemento.

De acordo com a figura 5, a superfície do epitélio do intestino médio anterior de ninfas de *T. brasiliensis* foi ligeiramente marcada pelas proteínas do MAC quando os insetos foram obrigados a ingerir 50µL de soro humano normal (Fig. 5-C). Esta marcação aumentou consideravelmente quando eles foram obrigados a ingerir o mesmo volume de soro concentrado 2 vezes (Fig. 5-D). Nenhuma marcação foi observada quando os insetos ingeriram sangue através da picada em voluntários humanos (Fig. 5-A) ou quando os insetos foram obrigados a ingerir 50µL de soro humano inativado, concentrado duas vezes (Fig. 5-E). Para fins comparativos, podemos observar a fluorescência natural no intestino destes insetos na Fig. 5-B.

O corante fluorescente iodeto de propídeo foi usado para evidenciar a morte celular no epitélio intestinal que foi exposto ao complemento presente no soro humano 2 vezes concentrado. A deposição do MAC no epitélio causa a morte celular após uma hora de exposição. A Fig. 6-B mostra um grupo de células mortas marcadas em vermelho pelo iodeto de propídeo e a ausência destas áreas

marcadas é observada nas ninfas que ingeriram soro humano inativado 2 vezes concentrado (Fig. 6-A).

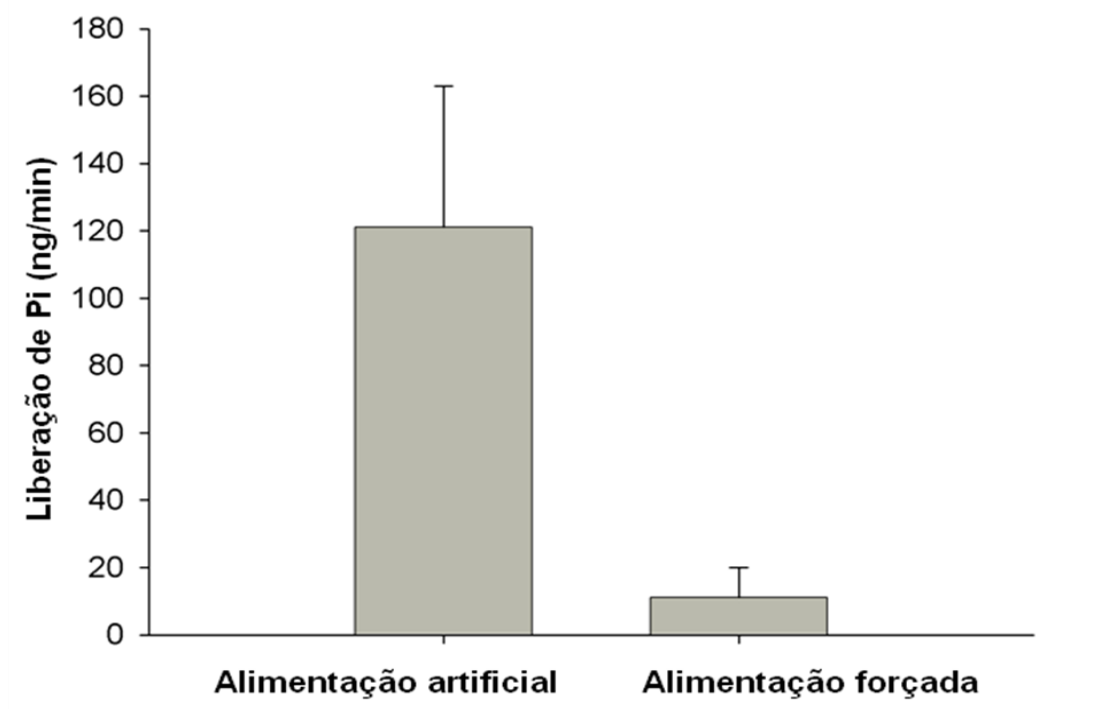


Figura 4: Atividade da apirase no conteúdo intestinal solúvel de ninfas de 4º estágio *Rhodnius prolixus* após alimentação em alimentador artificial e alimentação forçada: A atividade foi expressa como a liberação de fosfato inorgânico (Pi) em nanograma por minuto. O ensaio foi realizado com 1/12 do volume do conteúdo do intestino médio anterior (média $\pm$ erro padrão). O experimento apresentou diferença estatística entre os grupos (Teste T-Student: $p > 0,05$).

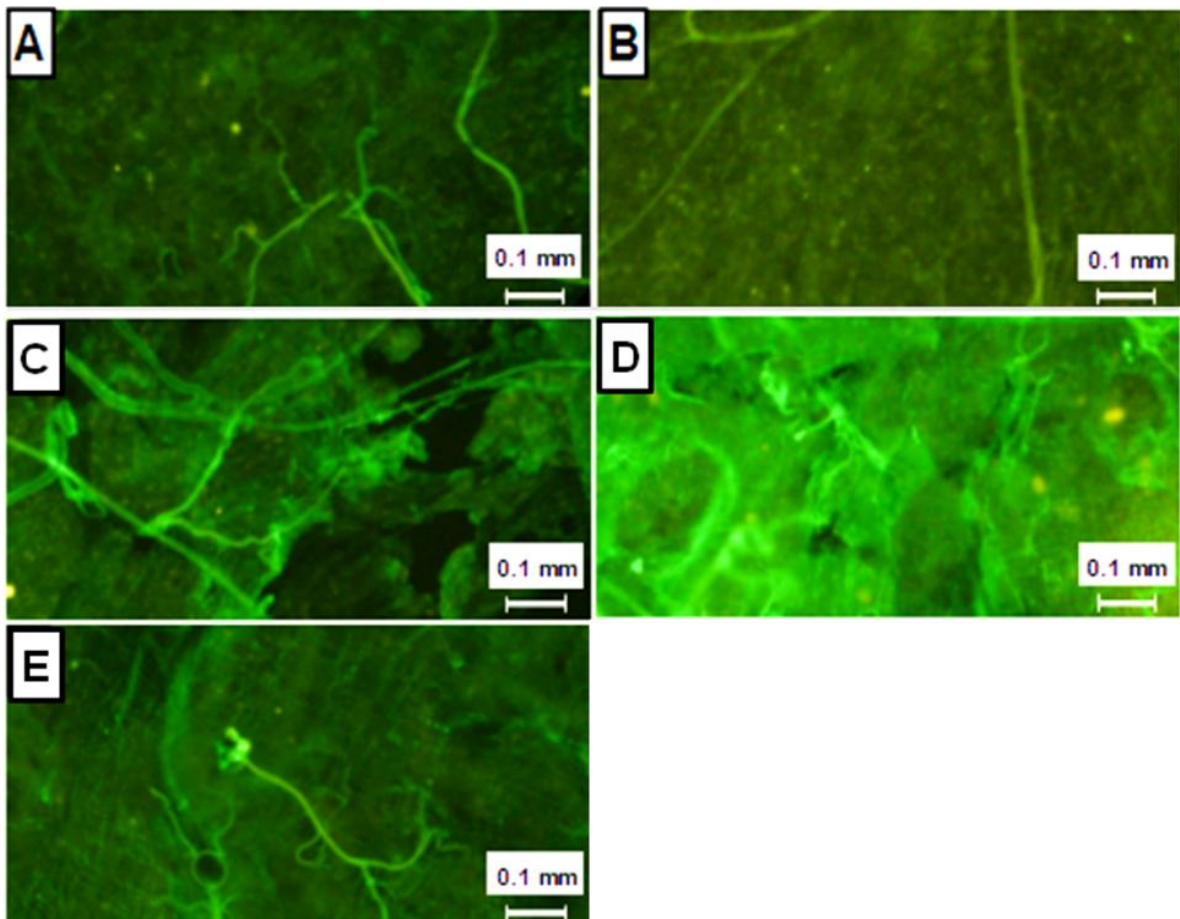


Figura 5: Proteção do intestino médio anterior de *T. brasiliensis* contra o ataque do sistema complemento: observação da deposição do MAC na parede intestinal

As ilustrações acima mostram a deposição do MAC sobre a superfície interna do intestino médio anterior de ninfas de 4º estágio de *T. brasiliensis* examinada em um microscópio de epifluorescência (450-490 nm excitação/ 535 nm emissão). **A-** Deposição do MAC na parede do intestino médio anterior após repasto sanguíneo em voluntários humanos. **B-** Fluorescência natural observada na parede do intestino médio anterior. **C-** Deposição do MAC na parede do intestino médio anterior após alimentação forçada de 50µL de soro humano normal. **D-** Aumento na deposição de MAC na parede do intestino médio anterior após alimentação forçada de 50µL de soro humano normal 2X concentrado. **E-** Deposição do MAC na parede do intestino médio anterior após alimentação forçada de 50µL de soro humano normal inativado 2X concentrado (aumento de 100X).

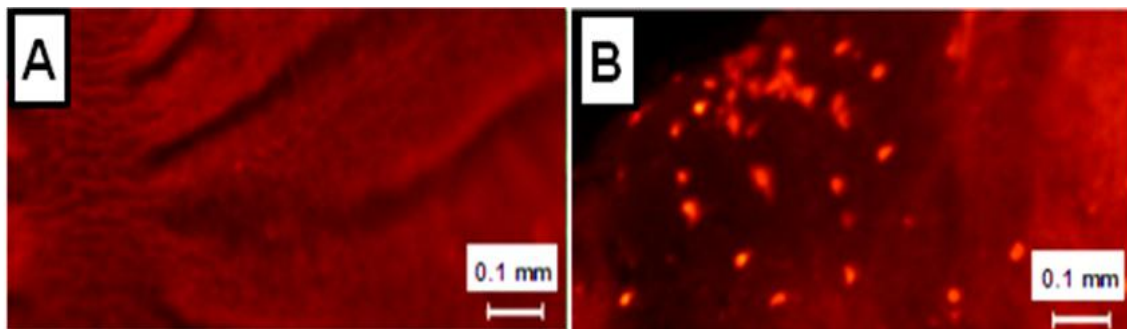


Figura 6: Proteção do intestino médio anterior de *T. brasiliensis* contra o ataque do sistema complemento: observação da morte celular após deposição do MAC

As ilustrações acima mostram a morte celular no intestino médio anterior de ninfas de 4º estágio de *T. brasiliensis* após a deposição do MAC em microscópio de epifluorescência (510-560 nm excitação/590 nm emissão). **A-** Ausência de células mortas após alimentação forçada de soro humano inativado 2x concentrado contendo IP. **B-** Presença de células mortas no epitélio intestinal após alimentação forçada de soro humano 2x concentrado contendo IP (Aumento de 100x).

4.2 Determinação do pH do intestino médio anterior de *T. brasiliensis* e o estudo da influência do pH no funcionamento do sistema complemento humano

O pH (média $\pm$ desvio padrão) medido no interior do intestino médio anterior de *T. brasiliensis* foi de $7,16 \pm 0,26$ (n= 6) nas primeiras duas horas após o repasto sanguíneo e continuou praticamente o mesmo após 24 h $7,02 \pm 0,05$ (n = 3). Para este estudo, assumimos que o pH no intestino médio anterior dos outros triatomíneos não é substancialmente diferente do observado em *T. brasiliensis*.

De acordo com os resultados mostrados na Fig. 7-B, a porcentagem da deposição de C3b pela via clássica foi semelhante em todos os pHs testados, não apresentando diferença significativa em relação ao pH 7,4. Porém, a deposição de C3b pela via alternativa foi semelhante ao observado no pH 7,4 apenas nos pHs 7,0 e 7,5. No pH 8,0 foi observada uma atividade equivalente a $41 \pm 3\%$ em relação ao pH 7,4 (Fig. 7-A). Uma vez que as vias alternativa e clássica funcionaram igualmente bem entre os pHs 7,0 e 7,5, e que o pH do sangue ingerido é 7,09 (dentro da faixa entre 7,0 e 7,5), todos os ensaios de inibição foram feitos da maneira tradicional, isto é, no pH 7,4.

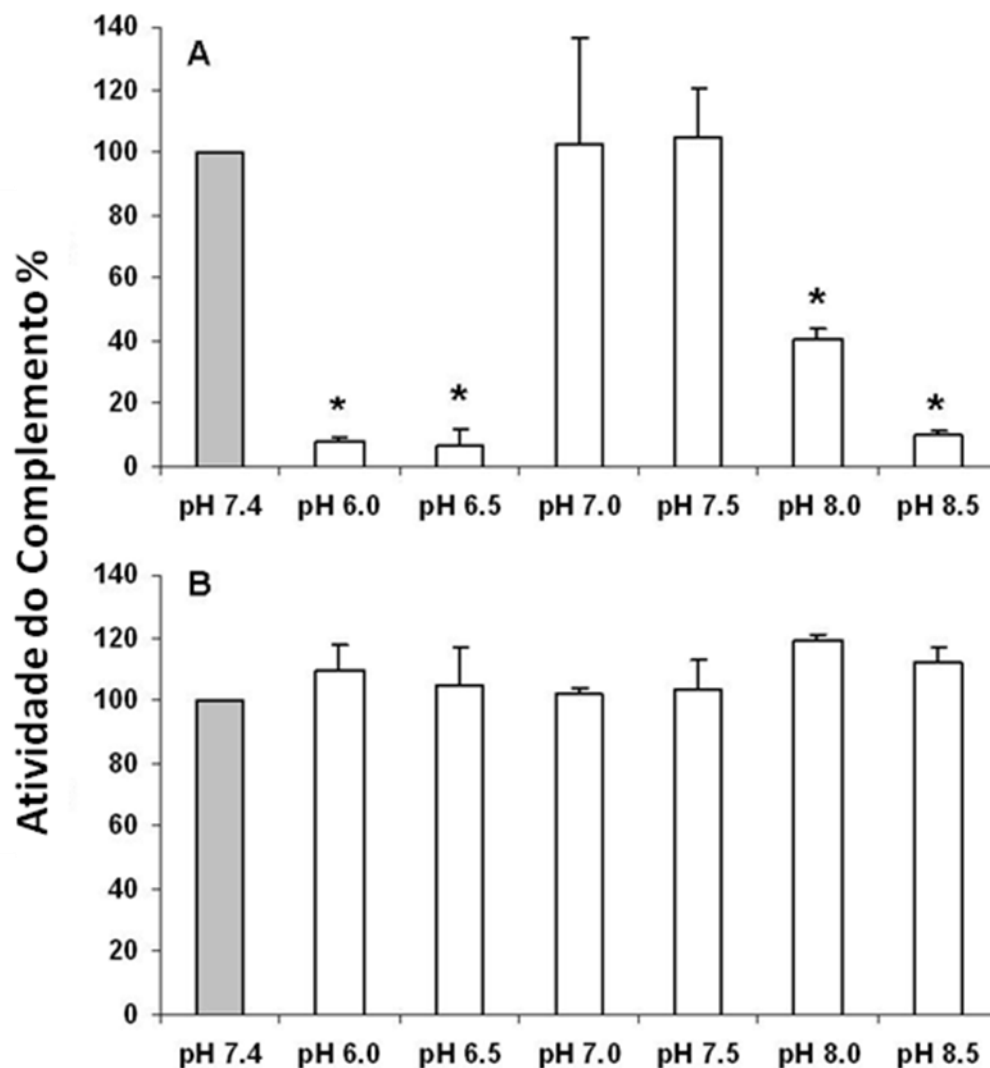


Figura 7: Porcentagem de atividade do sistema complemento em diferentes pHs: Interferência do pH na deposição de C3b pelas vias alternativa (A) e clássica (B). Os dados apresentados são a média das porcentagens de atividade do sistema complemento em relação à atividade no pH 7,4. Os dados marcados com (*) apresentaram diferença estatística em relação ao pH 7,4 ($p < 0.05$).

4.3 Atividade inibidora das vias alternativa e clássica do sistema complemento presente na saliva e no conteúdo intestinal dos triatomíneos

Todas as três espécies de triatomíneos estudadas foram capazes de inibir tanto a via clássica quanto a via alternativa do sistema complemento humano. Os dados gerados com os diferentes ensaios de atividade do sistema complemento na presença de saliva e conteúdo intestinal estão sumarizados nas tabelas 1 e 2, onde podemos observar o efeito dos inibidores em diferentes pontos durante o processo de ativação das vias clássica e alternativa. Esses dados indicam que os inibidores encontrados são capazes de atuar interrompendo a cascata do complemento nos seus primeiros eventos, durante a etapa de ativação, onde a inibição seria mais efetiva por impedir a amplificação do processo.

Nenhum dos materiais obtidos dos triatomíneos foi capaz de inibir a ligação do componente C1q às moléculas de IgG utilizadas para disparar a via clássica, indicando que a inibição dessa via ocorre numa etapa posterior a esse evento da cascata (Tab. 1 e 2). A deposição de C4b pela ativação da via clássica foi inibida pelo conteúdo intestinal das três espécies de triatomíneos (Tab. 2), porém somente a saliva de *T. brasiliensis* foi capaz de interromper a via clássica neste ponto (Tab. 1). Tanto a saliva quanto o conteúdo intestinal dos triatomíneos foram capazes de interromper a deposição de C3b pela via clássica (Tab. 1 e 2). A primeira etapa da ativação da via alternativa consiste na ativação de C3 por clivagem proteolítica, seguida pela deposição de C3b sob o substrato ativador. Esta etapa foi prontamente inibida pela saliva e pelo conteúdo intestinal das três espécies de triatomíneos estudadas (Tab. 1 e 2).

Tabela 1: Porcentagem de inibição do sistema complemento pela saliva de *Triatoma brasiliensis*, *T. infestans* e *Rhodnius prolixus*

Espécie	Número de glóbulos salivares por ensaio	Inibição da deposição de C1q pela VC (n)	Inibição da deposição de C4b pela VC (n)	Inibição da deposição de C3b pela VC (n)	Inibição da deposição de C3b pela VA (n)
<i>T. brasiliensis</i>	2	5±24 (3)	*46±6(5)	*34±15 (4)	*92±3 (3)
	1	2±16 (3)	16±9 (5)	22±16 (4)	*89±7 (3)
	0,5	6±2 (3)	6±16 (4)	13±13 (4)	*84±7 (3)
<i>T. infestans</i>	2	0±25 (3)	11±21 (7)	*56±5 (3)	*88±9 (3)
	1	11±3 (3)	13±16 (7)	*43±12 (3)	*80±15 (3)
	0,5	15±11 (3)	9±9 (7)	32±13 (3)	*74±18 (3)
<i>R. prolixus</i>	2	0±4 (5)	3±7 (3)	*33±23 (3)	*59±23 (5)
	1	0±1 (5)	2±6 (7)	28±25 (3)	*62±24 (5)
	0,5	0±2 (5)	0±8 (7)	25±31 (3)	*57±34 (5)

N: número de experimentos independentes realizado para cada tratamento. Os asteriscos indicam diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$). VA: via alternativa. VC: via clássica.

Tabela 2: Porcentagem de inibição do sistema complemento pelo conteúdo intestinal de *Triatoma brasiliensis*, *T. infestans* e *Rhodnius prolixus*

Espécie	Quantidade relativa de conteúdo intestinal por ensaio	Inibição da deposição de C1q pela VC (n)	Inibição da deposição de C4b pela VC (n)	Inibição da deposição de C3b pela VC (n)	Inibição da deposição de C3b pela VA (n)
<i>T. brasiliensis</i>	1	17±18 (3)	*51±9 (5)	*77±9 (4)	*80±4 (3)
	0,5	3±16 (3)	27±23 (5)	*60±18 (4)	*71±5 (3)
	0,25	8±14 (3)	13±37 (5)	*49±17 (4)	*46±8 (3)
<i>T. infestans</i>	1	22±31 (3)	*57±24 (4)	*51±35 (4)	*66±24 (3)
	0,5	20±34 (3)	29±18 (4)	*57±16 (4)	*47±37 (3)
	0,25	2±1 (3)	19±16 (4)	*45±28 (4)	*53±21 (3)
<i>R. prolixus</i>	1	3±3 (4)	*59±18 (3)	*35±14 (3)	*61±4 (3)
	0,5	0±1 (4)	47±29 (3)	33±24 (3)	*40±7 (3)
	0,25	0±2 (4)	34±35 (3)	20±20 (3)	*38±1 (3)

N: número de experimentos independentes realizado para cada tratamento. Os asteriscos indicam diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$). VA: via alternativa. VC: via clássica.

4.4 Atividade do sistema complemento humano na presença de homogenato de membranas perimicrovilares e microvilosidades intestinais de triatomíneos

De acordo com os resultados apresentados na figura 8, as membranas perimicrovilares e microvilosidades intestinais de ninfas de 4^o estágio das três espécies estudadas não interferiram na deposição de C3b após o disparo da via clássica ($p>0,05$, $n=3$).

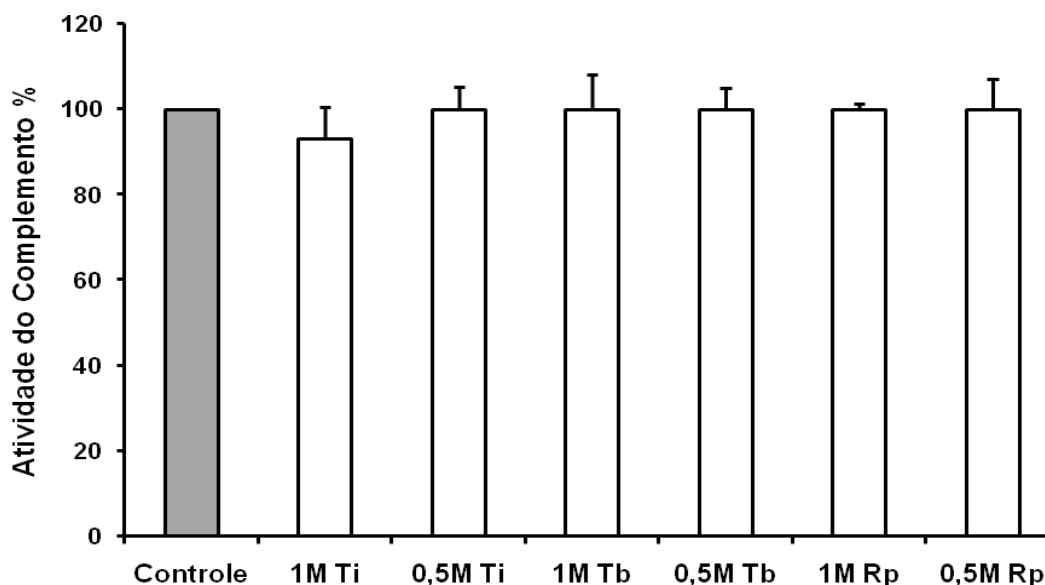


Figura 08: Porcentagem da atividade do sistema complemento humano medida através da deposição de C3b após o disparo da via clássica na presença do homogenato de membranas perimicrovilares e microvilosidades intestinais de triatomíneos

Interferência do homogenato de membranas perimicrovilares e microvilosidades intestinais (M) do intestino médio anterior de *T. brasiliensis* (Tb) *T. infestans* (Ti) e *R. prolixus* (Rp) na deposição do componente C3b após o disparo da via clássica. Os dados são porcentagens da média da atividade do sistema complemento (na presença ou ausência do homogenato) de no mínimo três experimentos independentes. Em todos os experimentos foi utilizado o conteúdo intestinal solúvel de *T. brasiliensis* como controle positivo de inibição. Em nenhum caso, os experimentos apresentaram diferença estatística em relação ao controle ($p>0,05$).

4.5 Determinação da presença de inibidores de baixo peso molecular no conteúdo intestinal de *T. infestans* e *T. brasiliensis*

O conteúdo intestinal de ninfas de 4º estágio de *T. brasiliensis* e *T. infestans* foi submetido a ultrafiltrações seriadas com ultrafiltros cujos limites de exclusão foi de 30, 10 e 5kDa. Foi realizada a medida da atividade do complemento na presença dos três materiais ultrafiltrados independentemente. Nos ensaios realizados com o material obtido das três ultrafiltrações, foi observada a presença de atividade inibidora do complemento no material ultrafiltrado sobre a deposição de C3b pela via clássica (*T. brasiliensis*: $24 \pm 12\%$; *T. infestans* $18 \pm 2\%$) e pela via alternativa (*T. brasiliensis*: $30 \pm 6\%$; *T. infestans* $66 \pm 12\%$). Desta forma, fica confirmada a presença de molécula(s) inibidora(s) do sistema complemento presentes no conteúdo intestinal de ambas espécies com peso molecular menor ou igual a 5 kDa (Fig. 9).

4.6 Atividade inibidora do complemento sobre a deposição de C3b presente na hemolinfa dos triatomíneos

A possível existência de inibidores do sistema complemento na hemolinfa das três espécies de triatomíneos também foi investigada. A hemolinfa de nenhuma delas inibiu a deposição de C3b nas vias clássica e alternativa (Fig. 10).

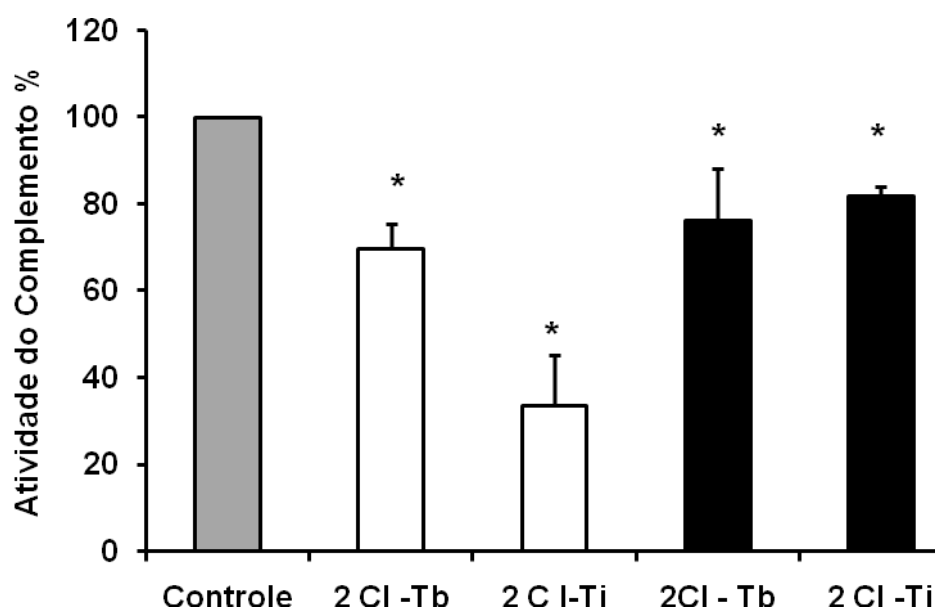


Figura 9: Porcentagem da atividade do sistema complemento na presença do conteúdo intestinal (CI) de *T. brasiliensis* (Tb) e *T. infestans* (Ti) após ultrafiltração

Os dados apresentados são a média das porcentagens da atividade do sistema complemento na presença do conteúdo intestinal, o equivalente a 2 intestinos (2CI) ultrafiltrados, cujo limite de exclusão é 5kDa. A atividade do complemento foi avaliada através da deposição de C3b pela via clássica (barras pretas) e pela via alternativa (barras brancas). Os dados marcados com (*) apresentaram diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$).

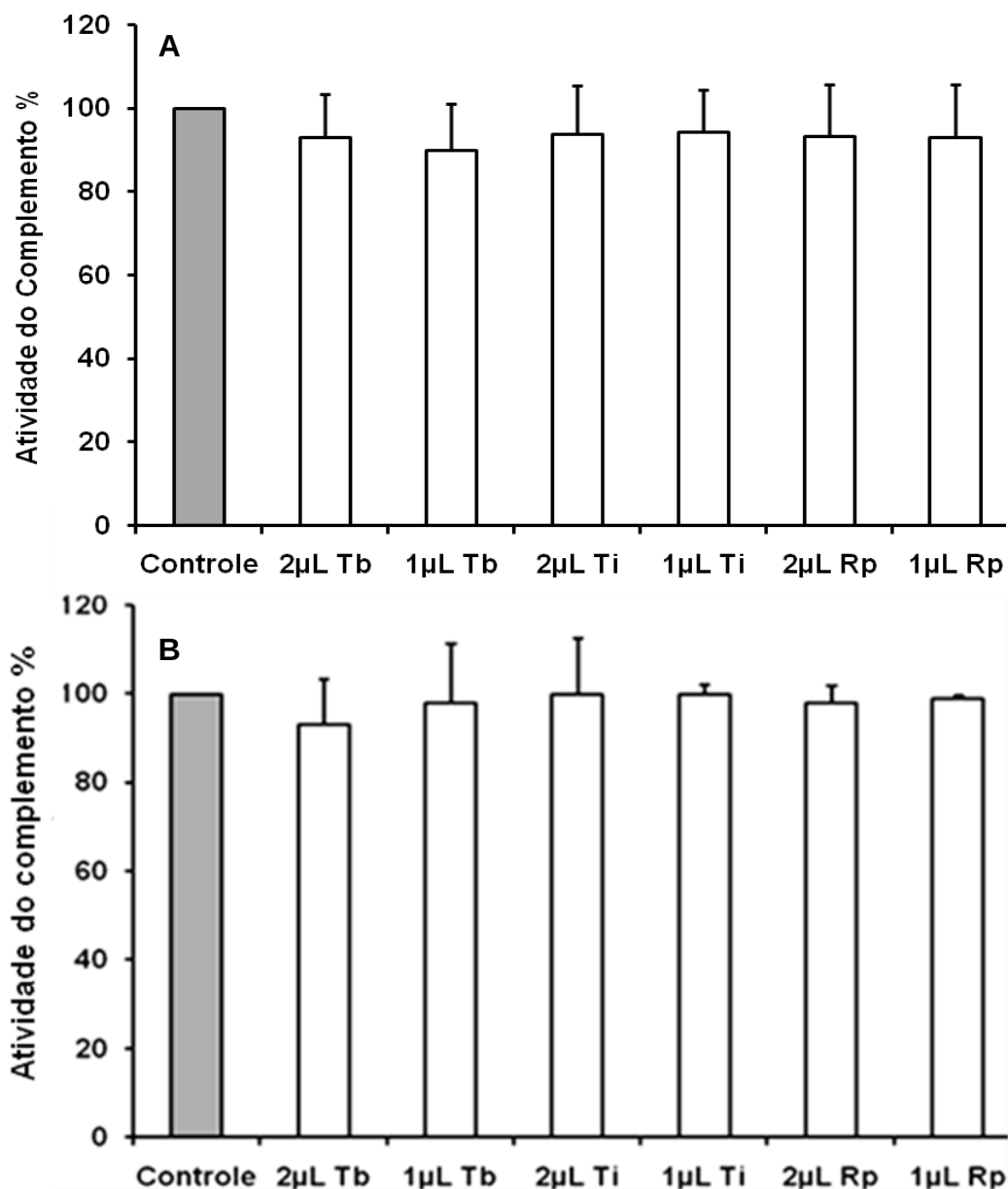


Figura 10: Porcentagem da atividade do sistema complemento na presença de hemolinfa dos triatomíneos

Interferência da hemolinfa de ninfas de 4º estágio de *T. infestans* (Ti), *T. brasiliensis* (Tb) e *R. prolixus* (Rp) na deposição do componente C3b após o disparo das vias alternativa (A) e clássica (B). Os dados apresentados são a média das porcentagens da atividade do sistema complemento na presença de hemolinfa. Em todos os experimentos foi utilizado o conteúdo intestinal solúvel de *T. brasiliensis* como controle positivo de inibição. Em nenhum caso, os experimentos apresentaram diferença estatística em relação ao controle ($p > 0,05$).

4.7 Atividade inibidora das vias alternativa e clássica do sistema complemento presente no conteúdo intestinal de fêmeas de *A. aegypti*

Além dos triatomíneos, o mosquito *A. aegypti* teve seu trato digestivo investigado a procura de algum inibidor do sistema complemento. Uma preparação contendo moléculas solúveis do intestino médio de duas fêmeas mostrou-se capaz de inibir significativamente a deposição de C3b pelas vias alternativa ($52 \pm 11\%$, $n=3$, $p<0,05$) e clássica ($24 \pm 5\%$, $n=3$, $p<0,05$) (Fig. 11).

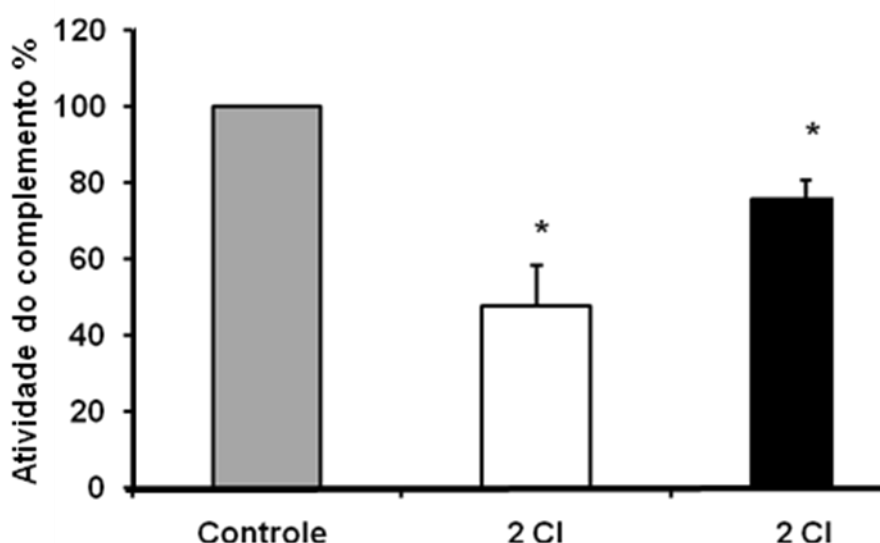


Figura 11: Porcentagem de atividade do sistema complemento na presença de conteúdo intestinal de fêmeas de *Aedes aegypti*

Interferência do conteúdo intestinal (CI), o equivalente a 2 intestinos, de fêmea *A. aegypti* na deposição de C3b após o disparo das vias alternativa (barra branca) e clássica (barra preta). Os dados apresentados são a média das porcentagens da atividade do sistema complemento na presença ou ausência de conteúdo intestinal de *A. aegypti*, de três experimentos independentes. Os dados marcados com (*) apresentaram diferença estatística em relação ao controle ($p<0,05$).

5. DISCUSSÃO

A presença de inibidores do sistema complemento na saliva de diferentes artrópodes hematófagos (^bRibeiro 1987; Cavalcante et al., 2003) sugere que eles devam ter um papel importante para o sucesso da hematofagia.

No presente estudo também foi mostrada, pela primeira vez, a presença de inibidores do complemento também no lúmen intestinal dos triatomíneos e do mosquito *A. aegypti*. É muito provável que os inibidores do complemento atuem na proteção do trato intestinal dos insetos durante e logo após a hematofagia. Uma vez que o epitélio intestinal destes insetos é formado por uma única camada de células (Billingsley, 1990), o dano causado pela ativação do complemento poderia levar à ruptura do trato digestivo e morte do inseto.

Os hemípteros apresentam uma delicada membrana que envolve as microvilosidades do intestino médio chamada de membrana perimicrovilar que se estende para o compartimento luminal com um fundo cego (Terra et al., 1996). Embora a membrana perimicrovilar possa conferir algum nível de proteção ao tubo digestivo dos triatomíneos, esta proteção não se mostrou suficiente para prevenir o ataque do complemento contra o epitélio e, conseqüentemente, evitar a morte celular (Figs. 5 e 6).

Diferentemente dos triatomíneos, o mosquito *A. aegypti* secreta uma matriz peritrófica (MP) no intestino posterior em torno do bolo sanguíneo ingerido. Segundo Devemport e Jacobs-Lorena (2005), a MP, em *A. aegypti*, é detectada 4-8 horas após a ingestão sanguínea e torna-se madura após 12 horas após o repasto. Desta forma, o epitélio intestinal torna-se totalmente exposto aos componentes do complemento nas primeiras horas após o repasto, tornando imprescindível a ação dos inibidores.

Já se sabe que durante a ingestão sanguínea em hospedeiros vivos, os triatomíneos (Soares et al., 2006) e outros insetos hematófagos, tais como *Lutzomyia longipalpis* (Cavalcante et al., 2006), ingerem regularmente a saliva

eliminada no local da picada juntamente com o sangue. Neste contexto, realizamos um procedimento de alimentação forçada usado para obrigar ninfas de 4º estágio de *T. brasiliensis* a ingerirem soro humano de tal forma que nenhuma ou pouca quantidade de saliva fosse ingerida juntamente com o soro. Quando os insetos se alimentavam em seres humanos, sob condições normais, a ação combinada de inibidores salivares e intestinais foi suficiente para prevenir o ataque ao epitélio (Figura 5-A). Quando o inseto foi forçado a ingerir soro humano 2x concentrado, a inibição promovida pelos componentes intestinais sozinhos não foi suficiente para prevenir o ataque do complemento ao intestino. Mesmo que parte da saliva tivesse sido ingerida juntamente com o soro, os inibidores ali presentes não apresentaram atividade inibidora suficiente para evitar a ação do MAC. O epitélio foi então marcado fortemente com anticorpos anti-C5-9 (anti-MAC) (Figura 5-D) confirmando que, nesta circunstância, o sistema complemento é ativado e o MAC é formado no epitélio. Como esperado, a ingestão de soro concentrado provocou a morte de células epiteliais. Tal fato foi evidenciado com o aparecimento de regiões marcadas com iodeto de propídeo (Figura 6-B).

A importância da inibição do sistema complemento para artrópodes hematófagos foi corroborada pela presença de inibidores no intestino de *A. aegypti*. De acordo com nossa hipótese, os artrópodes hematófagos que não têm inibidores salivares deveriam ter uma atividade inibidora no trato digestivo, como visto em *A. aegypti*. Realmente, o material obtido do conteúdo intestinal deste mosquito foi eficaz na inibição da deposição de C3b nas vias clássica e alternativa (Fig. 11).

O sistema complemento normalmente opera no pH 7,4 que é o pH normal do sangue e fluidos extracelulares. Porém, em *T. brasiliensis*, e provavelmente em outro triatomíneos, o sangue ingerido e armazenado no lúmen do intestino médio anterior é ligeiramente acidificado de pH 7,4 a 7,16. Até onde sabemos, não há nenhuma informação sobre a operação do sistema complemento em pHs diferentes de 7,4. Se o complemento é realmente danoso para os insetos, a ponto de os “forçar” a produzir inibidores, então, o complemento deveria ser ativo nas condições do intestino médio anterior dos triatomíneos, em pHs em torno de 7,0

e, até mesmo, em ambientes alcalinos como no intestino médio anterior do flebotomíneo *L. longipalpis*, onde o sangue ingerido é alcalinizado a pH 8,15, imediatamente após a ingestão de sangue (Santos et al., 2008). O mesmo acontece com algumas espécies de mosquito (inclusive *A. aegypti*), onde o pH alcança valores igual ou maiores que 8,0 depois de um repasto sanguíneo (del Pilar et al., 2005). Os resultados obtidos aqui sobre o desempenho do sistema complemento em diferentes pHs mostram que as vias clássica e alternativa poderiam ser ativadas em pH 7,16, no interior do intestino médio de triatomíneos, e até mesmo no pH~8,0, dentro do intestino médio de flebotomíneos e mosquitos. É possível que, sob estas circunstâncias, a via alternativa seja ativada pelos carboidratos do glicocálice das células intestinais e que a via clássica seja ativada pela ligação não específica de anticorpos naturais a estes carboidratos ou outras moléculas intestinais. Além disso, a presença de carboidratos do glicocálice poderia ativar a via das lectinas (MBL).

A figura 12 contém um esquema do processo de ativação do complemento pelas vias, clássica e alternativa, e mostra a formação de MAC pela ação de C3 convertases. As C3 convertases também operam como C5 convertases. Para simplificar, a ativação da via das lectinas foi omitida. A via das lectinas não é ativada por nenhum dos protocolos usados para ensaios de inibição no presente trabalho. Por isso, os resultados obtidos não foram influenciados por esta via. As marcas vermelhas no esquema indicam os pontos mais prováveis onde os inibidores salivares e/ou intestinais podem estar agindo ao longo da cascata do complemento.

A inibição do componente C4b da via clássica indica uma possível ação sobre C1r e/ou C1s, inibindo a sua ação proteolítica (C1r ativando C1s, ou C1s ativando C4) como ocorre com o inibidor C1-inh presente no soro normal (Bos et al., 2002). O bloqueio da deposição de C3b na via clássica poderia ser atribuído à ação dos inibidores em qualquer ponto mencionado antes ou na atividade proteolítica de C2a sobre C3. A presença de qualquer fator que apresse o decaimento de C2a no complexo de C4b-C2a-C3b também poderia levar ao mesmo resultado. Um inibidor capaz de apressar o decaimento de C2a seria

semelhante a C4bp, uma proteína encontrada solúvel no soro normal. C4bp acelera o decaimento de C2a no complexo C4b-C2a-C3b e age como cofator na clivagem de C4b pelo Fator I, outra proteína reguladora solúvel no plasma (Hardig et al., 1997).

A inibição da deposição de C3b na via alternativa poderia ser explicada pela inibição direta do Fator D. O Fator D é uma protease solúvel, já ativa no sangue, que tem alta especificidade para ativar o Fator B, quando este se encontra associado ao componente C3b. O Fator B ativado (Bb) é outra protease capaz de ativar C3, hidrolisando-o a C3b e C3a. A inibição de Bb poderia promover uma redução na deposição de C3b sobre a superfície ativadora. Qualquer molécula, presente na saliva ou no conteúdo intestinal de insetos, agindo em cima do complexo C3b-Bb-C3b e acelerando o decaimento de Bb também favoreceria a redução da deposição de C3b dentro da via alternativa.

Todas as proteases do sistema complemento são serino proteases (Arlaud et al., 1998). É interessante notar que a saliva de *T. brasiliensis* tem várias proteínas semelhantes às serpinas (Santos et al., 2008), as quais agiriam como inibidores de proteases.

Embora o material obtido das microvilosidades do intestino médio anterior não possa inibir a deposição de C3b pela via clássica, não podemos descartar a possível presença de um inibidor da formação de MAC que esteja inserido nas membranas do intestino médio, como observado em eritrócitos ou na superfície de outras células naturalmente exposta às proteínas do complemento (Arlaud et al., 1998).

Além da proteção do trato digestivo executada pelos inibidores da saliva e do intestino, a atividade de inibição do complemento encontrada na saliva também poderia estar diretamente envolvida na modulação do sistema imune de hospedeiros vertebrados. Realmente, sabe-se que até mesmo antígenos solúveis, quando opsonizados por C3b, são de 10 a 100 vezes mais eficientes em indução de resposta humoral que quando não estão opsonizados (Colomb et al., 1996). De fato, Dempsey et al. (1996) mostraram que a eficiência de antígenos

opsonizados com C3b poderia aumentar até 10.000 vezes se o antígeno alvo for duplamente marcado por C3b. A opsonização de antígenos (até mesmo antígenos solúveis) com C3b age como um “adjuvante” e torna estas moléculas muito mais eficientemente apresentadas ao sistema imune, gerando uma resposta secundária mais durável e a produção de anticorpos com altas especificidade e afinidade (Barrington et al., 2001; Colomb et al., 1996; Carrol 1998).

A presença de inibidores salivares capazes de agir na fase de ativação do sistema complemento reduziria consideravelmente a quantidade de antígenos opsonizados por C3b e, conseqüentemente, afetaria a apresentação destes antígenos ao sistema imune do hospedeiro. Em conseqüência, os hospedeiros seriam menos eficientes para executar uma resposta imune humoral contra as proteínas salivares, preservando suas atividades as quais são necessárias para uma hematofagia normal. Além da atividade inibidora do complemento, a saliva de insetos de hematófagos tem várias outras atividades que afetam o sistema imune (Gillespie et al., 2000; Wikel et al., 2001; Andrade et al., 2005; Titus et al., 2006; Villiers et al., 1999). Todas essas atividades estão de acordo com a idéia apresentada acima sobre o papel de inibidores do sistema imune na preservação de atividades salivares essenciais.

Por outro lado, os inibidores do complemento também podem ser importantes para a sobrevivência e o desenvolvimento biológico de patógenos, sensíveis ao complemento, em seus hospedeiros. Em *Ixodes scapularis* infectados, o complemento proveniente do repasto sanguíneo não suprime o crescimento de *Borrelia burgdorferi* no trato digestivo destes carrapatos (Rathinavelu et al., 2003). É possível que a atividade inibidora do complemento observada na saliva deste carrapato (^aRibeiro et al., 1987) também seja encontrada no lúmen intestinal com o mesmo objetivo de proteção do trato digestivo. Desta forma, a espiroqueta *B. burgdorferi* se beneficiaria desta atividade para manter o seu ciclo em seu hospedeiro.

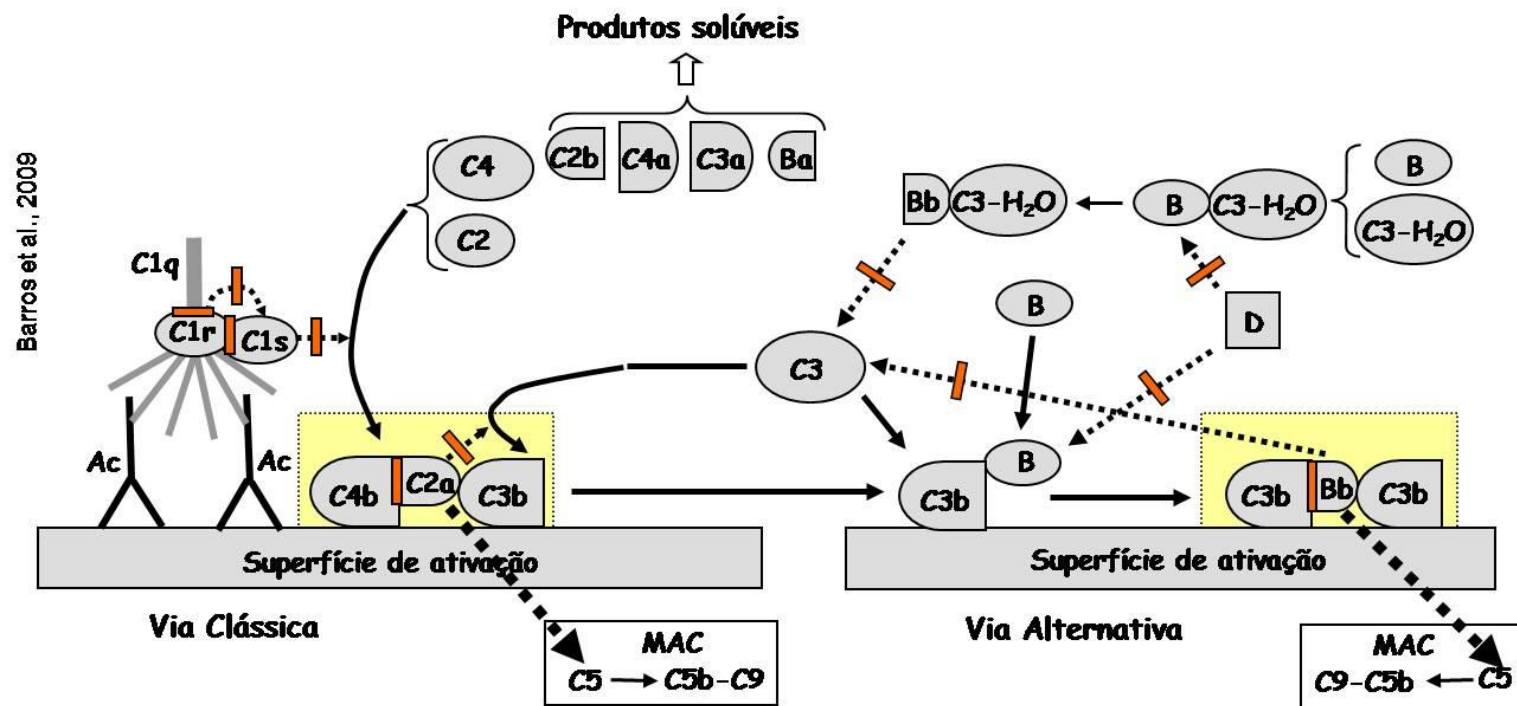


Figura 12: Esquema da fase de ativação do sistema complemento mostrando os pontos potencialmente alvos pelos inibidores salivares e intestinais dos triatomíneos: A via clássica é iniciada pela ligação de C1q, C1r e C1s (complexo C1) ao anticorpo (Ac) ligado à superfície de ativação. C1s (Ativação proteolítica) atua especificamente em C2 e C4, ativando-os. Uma vez clivado, o fragmento C4b é capaz de ligar-se, covalentemente, à superfície de ativação criando um sítio de ligação para C2a. O complexo C4b-C2a atua em C3, produzindo moléculas de C3b, os quais são capazes de ligar-se, covalentemente, à superfície próxima ao lugar de ativação. O complexo C4b-C2a-C3b atua em C5, gerando o complexo de ataque à membrana (MAC). Para a ativação da via alternativa, uma pequena fração de C3 presente no fluido extracelular passa por reações espontâneas com moléculas de H₂O, gerando C3b-H₂O. Estas moléculas podem interagir com o Fator B, gerando o complexo B-C3-H₂O. Após a clivagem do Fator B ligado no complexo pelo Fator D, o complexo Bb-C3-H₂O age sobre C3, de forma que o C3b gerado liga-se, covalentemente, à superfície de ativação, produzindo uma C3 convertase. O complexo C3b-Bb-C3b atua sobre o C5, gerando o MAC.

Assim como em carrapatos, é possível que a presença de moléculas inibidoras na saliva e no intestino de triatomíneos poderia também beneficiar o desenvolvimento de *T. cruzi*. Formas tripomastigotas deste parasita, achadas na circulação sanguínea, são resistentes ao complemento. Depois de um repasto sanguíneo, estas formas diferenciam-se, no intestino médio anterior do vetor, para formas epimastigotas que são muito sensíveis ao ataque do complemento (Garcia et al., 1984). Considerando que a diferenciação para epimastigotas inicia-se algumas horas após a ingestão dos parasitas (Garcia et al., 1991), é razoável a hipótese de que eles dependem dos inibidores de complemento para sobreviver dentro do vetor em meio ao sangue ingerido.

Assumindo que os inibidores do complemento podem proteger alguns patógenos, é razoável inferir que anticorpos do hospedeiro, dirigidos contra inibidores de complemento presentes na saliva e/ou no intestino de insetos hematófagos, inativando-os, podem prejudicar o desenvolvimento destes patógenos. Neste contexto, uma nova perspectiva se abre para a produção de vacinas direcionadas contra os inibidores do complemento, as quais poderiam interromper o ciclo biológico destes patógenos em seus respectivos vetores. Por outro lado, a ingestão sanguínea em um hospedeiro imunizado poderia ocasionar a morte destes insetos hematófagos, impedindo uma possível transmissão de patógenos a um novo hospedeiro.

6. CONCLUSÕES

Os inibidores do sistema complemento presentes na saliva e ou no lúmen intestinal devem exercer um papel importante na proteção das células do trato digestivo de diferentes insetos hematófagos após o repasto sanguíneo. Neste trabalho foram estudadas moléculas presentes na saliva e no lúmen intestinal dos triatomíneos capazes de inibirem a atividade do sistema complemento, atuando contra as vias clássica e alternativa. Em insetos, como *Aedes aegypti*, que não apresentam inibidores do complemento em sua saliva, a atividade inibidora das duas vias do complemento ocorre ao nível do trato digestivo. A descoberta de moléculas inibidoras do complemento pode trazer novas perspectivas para a busca de medidas que possam interferir na biologia desses vetores, bem como, na transmissão de patógenos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-RAUF, M.; ELLAR, D. J. Isolation and Characterization of Brush Border Membrane Vesicles from Whole *Aedes aegypti* Larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, v. 73, p. 45-51, 1999.

AGOSTONI, A. Inherited C1 inhibitor deficiency. *Complement Inflamm.*, v. 6, p. 112-118, 1989.

ANDRADE, B. B.; TEXEIRA, C. R.; BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *An. Acad. Bras. Cienc.*, v. 77, n. 4, p. 665-693, 2005.

ARAUJO, R. N.; SANTOS, A.; PINTO, F. S.; GONTIJO, N. F.; LEHANE, M. J.; PEREIRA, M. H. RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 36, p. 683-693, 2006.

ARLAUD, G. L.; VOLANAKIS, J. E.; THIELENS, N. M.; NARAYANA, S. V.; ROSSI, V.; XU, Y. The atypical serine proteases of the complement system. *Adv. Immunol.*, v. 69, p. 249-307, 1998.

BAGINSKI, E. S.; FOA, P. P.; ZAC, P. Microdetermination of inorganic phosphate, phospholipids and total phosphate in biological materials. *Clin. Chem.*, v. 13, p. 326-332, 1967.

BALDWIN, W. M. I. I. I.; PRUITT, S. K.; BRAUER, R. B.; DAHA, M. R.; SANFILIPPO, F. Complement in organ transplantation: contribution to inflammation, injury and rejection. *Transplant.*, v. 59, p. 797-808, 1995.

BAPTIST, B. A. The morphology and physiology of the salivary glands of Hemiptera-Heteroptera. *J. Cell. Sci.*, vs. 2-83, p. 91-139, 1941.

BARRINGTON, R.; ZHANG, M.; FISCHER, M.; CARROLL, M. C. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. *Immunol. Rev.*, v. 180, p. 5-15, 2001.

- BILLINGSLEY, P. F. The midgut ultrastructure of hematophagous insects. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 35, p. 219-248, 1990.
- BOS, I. G.; HACK, C. E.; ABRAHAMS, J. P. Structural and functional aspects of C1-inhibitor. *Immunobiol.*, v. 205, n. 4-5, p. 518-533, 2002.
- CARROLL, M. C. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat. Immunol.*, v. 5, p. 981-986, 2004.
- CARROLL, M. C. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 16, p. 545-68, 1998.
- CATTY, D.; RAYKUNDALIA, C. Production and quality control of polyclonal antibodies. In: CATTY, D. (ed.) *Antibodies: a practical approach*. Whashington: IRL Press Oxford. vol. 1, 1989. p. 19-80.
- CAVALCANTE, R. R.; PEREIRA, M. H.; FREITAS, J. M.; GONTIJO, N. F. Ingestion of saliva during carbohydrate feeding by *Lutzomyia longipalpis* (Diptera; Psychodidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 1, p. 85-87, 2006.
- CAVALCANTE, R. R.; PEREIRA, M. H.; GONTIJO, N. F. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitol.*, v. 127, p. 87-93, 2003.
- CHAGAS, C. R. J. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. esp., agente da nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* v.1, p. 159-218, 1909.
- CHARLAB, R.; VALENZUELA, J. G.; ROWTON, E. D.; RIBEIRO, J. M. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 96, p. 15155-15160, 1999.
- COLOMB, M. G.; VILLIERS, C. L.; VILLIERS, M-B.; GABERT, F. M.; SANTORO, L.; REY-MILLET, C. A. The role of antigen-bound C3b in antigen processing. *Res. Immunol.*, v. 147, n. 2, p. 75-82, 1996.

COURA, J. R.; FERNANDES, O.; ARBOLEDA, M.; BARRETT, T. V.; CARRARA, N.; DEGRAVE, W.; CAMPBELL, D. A. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 90, p. 278-279, 1996.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C.; FERNANDES, O.; VALENTE, A. S.; MILES, M. A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends in Parasitol.*, v. 18, p. 171-176, 2002.

DARZYNKIEWICZ, Z.; LI, X.; GONG, J.; HARA, S.; TRAGANOS, F. A. Analysis of cell death by flow cytometry. In: STUDZINSKI, G. P. (ed.) *Cell Growth and Apoptosis: A practical approach*. Oxford: Oxford University Press, 1995. cap. 8, p. 144-167.

DEL PILAR CORENA, M. V. L.; SALAZAR, M. I.; BOWERS, D.; FIEDLER, M. M.; SILVERMAN, D.; TU, C.; LINSEY, P. J. Carbonic anhydrase in the adult mosquito midgut. *J. Exp. Biol.*, v. 208, p. 3263-3273, 2005.

DEMPSEY, P. W.; ALLISON, M. E. D.; AKKARAJU, S.; GOODNOW, C. C.; FEARON, D. T. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science*, v. 271, p. 348-350, 1996.

DEVEMPORT, M.; JACOBS-LORENA, M. The peritrophic matrix of hematophagous insects. In: MARQUARDT, W. C. (ed.) *Biology of disease vectors*. Elsevier Academic Press, 2005. p. 297-310.

DIAS, E. Chagas' disease in the Americas. III. Central America. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.*, v. 4, p. 75-84, 1952.

DIAS, J. C. Control of Chagas disease in Brazil. *Parasitol. Today*, v. 3, p. 336-341, 1987.

DIAS, J. C.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 603-612, 2002.

DISCIPIO, R. G.; SCHRAUFSTATTER, I. U. The role of the complement anaphylotoxins in the recruitment of eosinophils. *Int. Immunopharmacol.*, v. 7, p. 1909-1923, 2007.

EIRAS, A. E.; JEPSON, P. C. Host location by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): a Wind tunnel study of chemical cues. *Bull. Entomol. Res.*, v. 81, p. 151-160, 1991.

FORATTINI, O. P.; BARATA, J. M.; SANTOS, J. L.; SILVEIRA, A. C. Feeding habits, natural infection and distribution of domiciliary triatominae in the central region of Brazil. *Rev. Saude Publica*, v. 16, p. 171-204, 1982.

FRANCISCHETTI, I. M.; RIBEIRO, J. M.; CHAMPAGNE, D.; ANDERSEN, J. Purification, cloning, expression, and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *J. Biol. Chem.*, v. 275, p. 12639-12650, 2000.

GARCIA, E. S.; VIEIRA, E.; GOMES, J. E. P. L.; GONÇALVES, A. M. Molecular biology of the interaction *Trypanosoma cruzi* / invertebrate host. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 79, p. 33-37, 1984.

GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol. Today*, v. 7, p. 240-244, 1991.

GILLESPIE, R. D. M.; MBOW, L.; TITUS, R. G. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol.*, v. 7, p. 319-331, 2000.

GORSKI, J. P.; HUGLI, T. E.; MULLER-EBERHARD, H. J. C4a: the third anaphylatoxin of the human complement system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 76, n. 10, p. 5299-5302, 1979.

GROVES, W. E. D.; F. C. JR.; SELLS, B. H. Spectrophotometric determination of microgram quantities of protein without nucleic acid interference. *Anal. Biochem.*, v. 22, p. 195-210, 1968.

GUHL, F.; VALLEJO, G. A. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: an updated review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 435-442, 2003.

HÄNSCH, G. M. The complement attack phase. In: ROTHER, K.; TILL, G. O. The complement system. Berlin: Springer-Verlag, 1988. cap. 1, p. 202-230.

HÄRDIG, Y.; HILLARP, A.; DAHLBÄCK, B. The amino-terminal module of the C4b binding protein alpha-chain is crucial for C4b binding and factor I-cofactor function. *Biochem. J.*, v. 323, n. 2, p. 469-475, 1997.

HELLMANN, K.; HAWKINS, R. I. Anticoagulant and Fibrinolytic Activities from *Rhodnius prolixus* Stal. *Nature*, v. 201, p. 1008-1009, 1964.

HELLMANN, K.; HAWKINS, R. I. Prolixins-S and prolixin-G; two anticoagulants from *Rhodnius prolixus* Stal. *Nature*, v. 207, p. 265-267, 1965.

KAMHAWI, S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect.*, v. 2, n. 14, p. 1765-73, 2000.

KAWASAKI, N.; KAWASAKI, T.; YAMASHINA, I. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum. *J. Biochem.*, v. 94, p. 937-947, 1983.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Tiatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, v. 163, p. 125-520, 1979.

MASSAD, E. The elimination of Chagas' disease from Brazil. *Epidemiol. Infect.*, v. 139, n. 9, p. 1153-1164, 2008.

MORGAN, B. P.; HARRIS, C. L. Complement regulatory proteins. London: Academic Press, 1999. p. 382.

NOESKE-JUNGBLUT, C.; HAENDLER, B.; DONNER, P.; ALAGON, A.; POSSANI, L.; SCHLEUNING, W. D. Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin. *J. Biol. Chem.*, v. 270, p. 28629-28634, 1995.

NOESKE-JUNGBLUT, C.; KRATZSCHMAR, J.; HAENDLER, B.; ALAGON, A.; POSSANI, L.; VERHALLEN, P.; DONNER, P.; SCHLEUNING, W. D. An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 5050-5053, 1994.

PEREIRA, M. H.; GONTIJO, N. F.; GUARNERI, A. A.; SANT'ANNA, M. R.; DIOTAIUTI, L. Competitive displacement in Triatominae: the *Triatoma infestans* success. *Trends Parasitol.*, v.22, n. 11, p. 516-520, 2006.

PEREIRA, M. H.; SOUZA, M. E. VARGAS, A. P.; MARTINS, M. S.; PENIDO, C. M.; DIOTAIUTI, L. Anticoagulant activity of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* saliva (Hemiptera/Triatominae). *Acta Trop.*, v. 61, n. 3, p. 255-261, 1996.

PETERSEN, S. V.; T., S.; JESEN, L.; STEFFENSEN, R.; JENSENIUS, J. C. An assay for the manna-binding lectin pathway of complement activation. *J. Immunol. Meth.*, v. 257, p. 107-116, 2001.

RATHINAVELU, S.; BROADWATER, A.; DA SILVA, A. M. Does host complement kill *Borrelia burgdorferi* within ticks? *Infect. Immun.*, v. 77, p. 822-829, 2003.

^ARIBEIRO, J. M. *Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity. *Exp. Parasitol.*, v. 64, p. 347-353, 1987.

^BRIBEIRO, J. M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 32, p. 463-478, 1987.

RIBEIRO, J. M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect. Agents Dis.*, v. 4, p. 143-152, 1995.

RIBEIRO, J. M.; FRANCISCHETTI, I. M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 48, p. 73-88, 2003.

RIBEIRO, J. M.; GARCIA, E. S. Platelet antiaggregating activity in the salivary secretion of the blood sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Experientia*, v. 37, p. 384-386, 1981.

RIBEIRO, J. M. C.; SARKIS, J. J. F. Anti-thromboxane activity in *Rhodnius prolixus* salivary secretion. *J. Insect Physiol.*, v. 28, n. 8, p. 655-660, 1982.

RIBEIRO, J. M.; MARINOTTI, O.; GONZALES, R. A salivary vasodilator in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Br. J. Pharmacol.*, v. 101, p. 932-936, 1990.

RIBEIRO, J. M.; NUSSENZVEIG, R. H. Nitric oxide synthase activity from a hematophagous insect salivary gland. *FEBS Lett.*, v. 330, p. 165-168, 1993.

RIBEIRO, J. M. C.; HAZZARD, J. M. H.; NUSSENZVEIG, R. H.; CHAMPAGNE, D. E.; WALKER, F. A. Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a bloodsucking insect. *Science*, v. 260, p. 539-541, 1993.

RIBEIRO, J. M.; SCHNEIDER, M.; GUIMARAES, J. A. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Biochem. J.*, v. 308, p. 243-249, 1995.

SANTOS, V. C.; ARAÚJO, R. N.; MACHADO, L. A. D.; PEREIRA, M. H.; GONTIJO, N. F. The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912): pH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control. *J. Exp. Biol.*, v. 211, p. 2792-2800, 2008.

SARKIS, J. J.; GUIMARAES, J. A.; RIBEIRO, J. M. Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus*: Kinetics and purification. *Biochem. J.*, v. 233, p. 885-891, 1986.

SCHOFIELD, C. J. *Triatominae, biología y control*. United Kingdom: Eurocommunica Publications, 1994. 79p.

SCHOFIELD, C. J.; DIAS, J. C. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv. Parasitol.*, v. 42, p. 1-27, 1999.

SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop.*, v.110, n. 2-3, p. 88-100, 2009.

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.*, v. 22, n. 12, p. 583-588, 2006.

SCHOELER, G. B.; WIKEL, S. K. Modulation of host by hematophagous arthropods. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 95 n. 8, p. 755-771, 2001.

SILVEIRA, A. C.; FEITOSA, V. R.; BORGES, R. Distribution of Triatominae captured in a domestic environment, 1975/83, Brazil. *Rev. Bras. Malariol. Doencas Trop.*, v. 36, p. 15-312, 1984.

SIM, R. B.; DODDS, A. W. The complement system: an introduction. In: DODDS, A. W.; SIM, R. B. (ed.) *Complement: A practical approach*. Oxford: Oxford University Press, 1997. cap. 1, p. 1-18.

SIM, R. B.; LAICH, A. Serine proteases of the complement system. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 28, p. 545-550, 2000.

SMITH, J. J. B. Effect of diet viscosity on the operation of the pharyngeal pump in the blood-feeding bug *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol.*, v. 82, p. 93-104, 1980.

SOARES, A. C.; CARVALHO-TAVARES, J.; GONTIJO, N. F.; DOS SANTOS, V. C.; TEIXEIRA, M. M.; PEREIRA, M. H. Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae; Triatominae) in mouse skin. *J. Insect Physiol.*, v. 52, p. 468-472, 2006.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C.; BAKER, J. E. Compartmentalization of digestion. In: LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. (ed.) *Biology of the insect midgut*. Londres: Chapman & Hall, 1996. p. 206-235.

TITUS, R. G.; BISHOP, J. V.; MEJIA, J. S. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunol.*, v. 28, p. 131-141, 2006.

THIEL, S.; VORUP-JENSEN, T.; STOVER, C.; SCHWAELE, W.; LAURSEN, S. B.; POUSEN, K. A second serine protease associated with mannose-binding lectin that activates complement. *Nat.*, v. 386, p. 506-510, 1997.

VILLIERS, C. L.; CRETIN, F.; LEFEBVRE, N.; MARCHE, P. N.; VILLIERS, M. B. A new role for complement C3: regulation of antigen processing through an inhibitory activity. *Mol. Immunol.*, v. 45, p. 3509-3516, 2008.

VILLIERS, M. B.; VILLIERS, C. L.; LAHARIE, A. L.; MARCHE, P. N. Different stimulating effects of complement C3b and complete Freund's adjuvant on antibody response. *Immunopharmacol.*, v. 42, p. 151-157, 1999.

[VOLANAKIS, J. E.](#); [NARAYANA, S. V.](#) Complement factor D, a novel serine protease. *Protein Sci.*, v. 5, n. 4, p. 553-564, 1996.

VORUP-JENSEN, T.; PETERSEN, S. V.; HANSEN, A. G.; POULSEN, K.; SCHWAEBLE, W.; SIM, R. B.; REID, K. B.; DAVIS, S. J.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. Distinct pathways of mannan-binding lectin (MBL) and C1-complex autoactivation revealed by reconstitution of MBL with recombinant MBL-associated serine protease-2. *J. Immunol.*, v. 165, p. 2093-2100, 2000.

WIKEL, S. K.; ALARCON-CHAIDEZ, F. J. Progress toward molecular characterization of ectoparasite modulation of host immunity. *Vet. Parasitol.*, v. 101, p. 275-287, 2001.

Organização Mundial da Saúde. www.who.int – visto em setembro de 2008.

Organização Pan-Americana da Saúde. www.opas.gov.br – visto em setembro de 2008.

Centro de Controle e Prevenção de Doenças. www.cdc.gov/chagas/epi.html - visto em setembro de 2008.